



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115947849 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 11

(21) 申请号	202211312212.4	C07K 19/00 (2006.01)
(22) 申请日	2019.12.20	C07K 14/605 (2006.01)
(66) 本国优先权数据		A61K 39/395 (2006.01)
201811573634.0	2018.12.21 CN	A61K 38/26 (2006.01)
201811606887.3	2018.12.27 CN	A61P 3/10 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		A61P 3/08 (2006.01)
201980071999.X	2019.12.20	A61P 3/04 (2006.01)
(71) 申请人	江苏恒瑞医药股份有限公司	A61P 3/06 (2006.01)
地址	222047 江苏省连云港市经济技术开 发区昆仑山路7号	A61P 9/10 (2006.01)
申请人	上海恒瑞医药有限公司	G01N 33/577 (2006.01)
(72) 发明人	曹卓晓 罗肖 何宁 胡齐悦 张连山 陶维康	G01N 33/68 (2006.01)
(51) Int. Cl.		
C07K 16/28	(2006.01)	权利要求书3页 说明书45页 序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

双特异性蛋白

(57) 摘要

本公开提供双特异性蛋白。具体而言,本公开提供一种人GCGR抗体、GLP-1肽及其突变体,以及GCGR抗体与GLP-1肽融合形成的双特异性蛋白及其制备方法,可用于减肥、治疗糖尿病。

1. 一种抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含选自如下所示的重链可变区和轻链可变区的组合:

重链可变区,其包含分别如SEQ ID NO:20、21和22所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和轻链可变区,其包含分别如SEQ ID NO:23、24和25所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

2. 根据权利要求1所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其是鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、或人源化抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求2所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述人源化抗体包含源自人抗体的框架区或其框架区变体,其中:

所述框架区变体在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区上分别具有至多10个氨基酸的回复突变。

4. 根据权利要求2所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含选自如下所示的轻链可变区和重链可变区组合:

重链可变区,其序列如SEQ ID NO:4所示或与SEQ ID NO:4所示具有至少90%序列同一性;和

轻链可变区,其序列如SEQ ID NO:5所示或与SEQ ID NO:5所示具有至少90%序列同一性。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体,进一步包括抗体恒定区,

优选地,所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恒定区及其常规变体,所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体,

更优选包含SEQ ID NO:72所示的人抗体重链恒定区和SEQ ID NO:73所示的人抗体轻链恒定区。

6. 根据权利要求5所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括选自如下所示的重链和轻链的组合:

所述重链为SEQ ID NO:80所示或与其具有至少85%序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:81所示或与其具有至少85%序列同一性。

7. 一种抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中包含选自如下所示的重链可变区和轻链可变区组合:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:4所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:5所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

8. 根据权利要求1至7任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体、二聚化的V区(双抗体)和二硫键稳定化的V区(dsFv)。

9. 一种双特异性蛋白,其包含GLP-1肽和抗GCGR抗体或其抗原结合片段,所述GLP-1肽通过肽键或接头共价连接至所述的抗GCGR抗体或其抗原结合片段。

10. 根据权利要求9所述的双特异性蛋白,其中:

所述GLP-1肽的羧基端通过肽键或接头连接至所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合

片段的重链可变区的氨基端;或者

所述GLP-1肽的羧基端通过肽键或接头连接至所述抗GCGR抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基端。

11. 根据权利要求10所述的双特异性蛋白,其中所述的抗GCGR抗体或其抗原结合片段是权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段。

12. 根据权利要求9至11任一项所述的双特异性蛋白,其中:

所述GLP-1肽是SEQ ID NO:91所示的GLP-1肽或其变体,

所述GLP-1肽变体为SEQ ID NO:91所示GLP-1肽中包含Q17E、I23V、K28R和G30R中一个或更多个氨基酸突变,

优选地,所述GLP-1肽变体包含Q17E突变、或包含Q17E和I23V突变。

13. 根据权利要求12所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽变体的序列如SEQ ID NO:92、93、94、95、96、97、98或99所示。

14. 根据权利要求13所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白包含第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链包含权利要求1至8任一项所述抗GCGR的单克隆抗体的重链;所述第二多肽链包含权利要求1至8任一项所述抗GCGR的单克隆抗体的轻链;其中:

所述第一多肽链包含SEQ ID NO:109所示的多肽,和

所述第二多肽链包含SEQ ID NO:81所示的多肽。

15. 一种GLP-1肽变体,所述GLP-1肽变体是在SEQ ID NO:91所示的GLP-1肽基础上包含Q17E、I23V、K28R和G30R中一个或更多个氨基酸突变,优选地,所述GLP-1肽变体包含Q17E突变、或包含Q17E和I23V突变。

16. 根据权利要求15所述的GLP-1肽变体,所述GLP-1肽变体的序列如SEQ ID NO:92、93、94、95、96、97、98或99所示。

17. 一种药物组合物,其含有:

治疗有效量的根据权利要求1至8任一项所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或根据权利要求15或16所述的GLP-1肽变体,以及

一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

18. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或根据权利要求15或16所述的GLP-1肽变体。

19. 一种重组载体,其包含权利要求18所述的分离的核酸分子。

20. 一种宿主细胞,其转化有权利要求19所述的重组载体,所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,优选为真核细胞,更优选哺乳动物细胞或昆虫细胞。

21. 一种制备权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或根据权利要求15或16所述的GLP-1肽变体的方法,所述方法包括:

培养权利要求20所述的宿主细胞形成权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或根据权利要求15或16所述的GLP-1肽变体,以及

从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段、或双特异性蛋白、或GLP-1肽变体。

22. 一种检测样本中人GCGR的试剂,其包含权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段。

23. 一种降低受试者血糖浓度的方法,所述方法包括:

向受试者施用治疗有效量的权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或权利要求15或16所述的GLP-1肽变体,或权利要求17所述的药物组合物,

优选地,所述治疗有效量为单位剂量中含有0.1至3000mg的权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或权利要求15或16所述的GLP-1肽变体。

24. 一种治疗代谢障碍的方法,所述方法包括:

向受试者施用治疗有效量的权利要求1至8任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或权利要求9至14任一项所述的双特异性蛋白,或权利要求15或16所述的GLP-1肽变体,或权利要求17所述的药物组合物;

优选地,所述代谢障碍选自:代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化和糖尿病前期状态。

双特异性蛋白

[0001] 本申请是申请号为201980071999.X,申请日为2019年12月20日,发明名称为“双特异性蛋白”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2018年12月21日提交的专利申请201811573634.0和2018年12月27日提交的专利申请201811606887.3的优先权;两者通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及人GCGR抗体、GLP-1肽及其突变体,以及GCGR抗体与GLP-1肽融合形成的双特异性蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

[0004] 这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

[0005] 糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种表现为胰岛素分泌缺陷和/或胰岛素作用障碍,以高血糖为特征的代谢性疾病,其发病主要是胰岛素与胰高血糖素共同作用的结果。

[0006] GLP-1是影响胰岛素分泌最主要的激素之一,与胰高血糖素(Glucagon)一起均来源于前胰岛素原。前胰岛素原由约158个氨基酸组成,在不同的部位被切割成不同的肽链。人体内具有生物活性的GLP-1主要包括GLP-1(7-36)酰胺和GLP-1(7-37)两种形式。GLP-1通过小肠L细胞分泌,主要以葡萄糖浓度依赖性方式促进胰岛素分泌,保护胰岛β细胞,抑制胰高血糖素分泌来降低机体血糖水平。同时GLP-1还有抑制胃排空,降低食欲的作用。临床可用于II型糖尿病和肥胖症的治疗。机体内天然活性GLP-1的半衰期很短(不足2分钟),很容易被机体内DPPIV酶降解,不具有临床使用价值。

[0007] 延长半衰期一直是GLP-1类药物研发的主要方向,目前已有多款GLP-1激动剂上市,如度拉糖肽(Dulaglutide)和索马鲁肽(Semaglutide)等。虽然GLP-1在疗效上已经获得人们的充分肯定,但也存在诸多副作用,主要表现为胃肠道症状,低血糖,胰腺炎及肾损伤等。

[0008] 胰高血糖素与胰岛素作用相反,主要起升高机体血糖的作用。胰高血糖素是由胰岛α细胞分泌的具有29个氨基酸的肽,与肝细胞膜上受体GCGR结合后主要通过激活下游cAMP/PKA途径,加速糖原分解、脂肪分解和糖异生,使血糖升高。

[0009] 研究发现,GCGR基因敲除鼠呈现出GLP-1升高,肝糖输出减少,脂代谢增加,食欲减退等一系列表型。GCGR是糖尿病治疗最热门的靶点之一,但目前针对GCGR的拮抗类药物研发进展缓慢。REMD Biotherapeutics公司的REMD-477,目前是最前沿的GCGR单克隆抗体药物,处于临床二期。

[0010] 现有技术已在专利CN101589062A、CN101983208A、CN102482350A、CN103314011A、CN105189560A、CN107614695A、US20180273629A1、W02013059531A1等专利中公开GCGR抗体,但仍有待于提供新的高效的GCGR抗体及糖尿病治疗方法。

发明内容

[0011] 本公开提供一种抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段。该抗体或其抗原结合片段具有与人GCGR(或其所包含的抗原表位)结合的能力。

[0012] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含选自如下a)或b)的重链可变区和轻链可变区的组合:

[0013] a)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:48、49和50所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:51、52和53所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0014] b)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:38、39和54所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:55、56和57所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

[0015] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含选自如下i)至vi)的重链可变区和轻链可变区的任一组合:

[0016] i)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:14、15和16所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:17、18和19所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0017] ii)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:20、21和22所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:23、24和25所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0018] iii)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:26、27和28所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:29、30和31所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0019] iv)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:32、33和34所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:35、36和37所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0020] v)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:38、39和40所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:41、42和43所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0021] vi)所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:38、39和44所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:45、46和47所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

[0022] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0023] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述人源化抗体包含源自人抗体的框架区或其框架区变体,所述框架区变体为在人抗体的轻链框架区上具有至多10个回复突变,和/或,所述框架区变体在人抗体的重链框架区基础上具有至多10个、至多9个、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个、至多3个、至多2个、至多1个氨基酸的回复突变。

[0024] 在一些实施方式中,所述框架区变体包含选自:

[0025] aa)轻链可变区中包含42G、44V、71Y和87F中的一个或多个氨基酸回复突变,和/或重链可变区中包含38K、48I、67A、69F、71A、73P、78A和93S中的一个或多个氨基酸回复突变;或者

[0026] ab)轻链可变区中包含38L、44V、59S、70E和71Y中的一个或多个氨基酸回复突变,

和/或重链可变区中包含38K、48I、66K、67A、69L、73R、78M和94S中的一个或多个氨基酸回复突变。进一步地,所述回复突变位点的位置依据Kabat编号规则确定。

[0027] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列如SEQ ID NO:2、61、62、63和64任一所示或与SEQ ID NO:2、61、62、63和64任一所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区;和/或

[0028] 序列如SEQ ID NO:3、58、59和60任一所示或与SEQ ID NO:3、58、59和60任一所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0029] 在一些实施方案中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列如SEQ ID NO:63所示的重链可变区和序列如SEQ ID NO:58所示的轻链可变区。

[0030] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列为SEQ ID NO:4所示或与SEQ ID NO:4所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区和/或序列为SEQ ID NO:5所示或与SEQ ID NO:5所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0031] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列为SEQ ID NO:6所示或与SEQ ID NO:6所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区和/或序列为SEQ ID NO:7所示或与SEQ ID NO:7所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0032] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列为SEQ ID NO:8、68、69、70和71任一所示或与SEQ ID NO:8、68、69、70和71任一所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区和/或序列为SEQ ID NO:9、65、66和67任一所示或与SEQ ID NO:9、65、66和67任一所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列如SEQ ID NO:71所示的重链可变区和序列如SEQ ID NO:67所示的轻链可变区。

[0034] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列为SEQ ID NO:10所示或与SEQ ID NO:10所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区和/或序列为SEQ ID NO:11所示或与SEQ ID NO:11所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0035] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含序列为SEQ ID NO:12所示或与SEQ ID NO:12所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的重链可变区和/或序列为SEQ ID NO:13所示或与SEQ ID NO:13所示具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的轻链可变区。

[0036] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体

为全长抗体,进一步包括抗体恒定区,具体地,所述抗体恒定区的重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恒定区及其常规变体,所述抗体恒定区的轻链恒定区选自人抗体κ和λ链恒定区及其常规变体,更优选包含SEQ ID NO:72所示的人抗体重链恒定区和SEQ ID NO:73所示的人轻链恒定区。

[0037] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0038] 所述重链为SEQ ID NO:74、76或78所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:75所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0039] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0040] 所述重链为SEQ ID NO:74、76或78所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:77所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0041] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0042] 所述重链为SEQ ID NO:74、76或78所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:79所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0043] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0044] 所述重链为SEQ ID NO:80所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:81所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0045] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0046] 所述重链为SEQ ID NO:82所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:83所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0047] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0048] 所述重链为SEQ ID NO:84所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:85所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0049] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0050] 所述重链为SEQ ID NO:86所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:87所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0051] 在一些实施方式中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,其中:

[0052] 所述重链为SEQ ID NO:88所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性,且所述轻链为SEQ ID NO:89所示或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0053] 在一些实施方案中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含如序列如SEQ ID NO:78所示的重链和序列如SEQ ID NO:79所示的轻链。

[0054] 在一些实施方案中,所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含如序列如SEQ ID NO:84所示的重链和序列如SEQ ID NO:85所示的轻链。

[0055] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含选自如下ac)至ah)的重链可变区和轻链可变区的任一组合:

[0056] ac)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:2所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:3所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0057] ad)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:4所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0058] ae)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:6所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:7所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0059] af)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:8所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:9所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;

[0060] ag)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:10所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:11所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0061] ah)所述重链可变区包含与SEQ ID NO:12所示重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:13所示轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

[0062] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体、二聚化的V区(双抗体)和二硫键稳定化的V

区(dsFv)。

[0063] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于与如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人GCGR(或其表位)。

[0064] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,具有以下特征中的至少一种:

[0065] i.以小于500nM、小于450nM、小于400nM、小于350nM或小于300nM(优选小于300nM)IC50值的水平阻断人GCGR与人胰高血糖素结合的拮抗活性;

[0066] ii.阻断食蟹猴或恒河猴GCGR与食蟹猴或恒河猴胰高血糖素结合的拮抗活性;

[0067] iii.抑制人血糖浓度的升高;

[0068] iv.阻断小鼠GCGR与小鼠胰高血糖素结合的拮抗活性。

[0069] 在一些实施方式中,所述抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段与如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段结合相同的抗原表位。

[0070] 另一方面,本公开提供一种双特异性蛋白。在一些实施方式中,所提供的一种双特异性蛋白,所述双特异性蛋白包含GLP-1肽和GCGR抗体,所述GLP-1肽与所述GCGR抗体的多肽链之间由肽键或接头共价连接。

[0071] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽的羧基端与GCGR抗体的重链可变区的氨基端由肽键或接头连接,或者所述GLP-1肽的羧基端与GCGR抗体的轻链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

[0072] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽的羧基端与GCGR抗体的重链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

[0073] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽的羧基端与GCGR抗体的轻链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

[0074] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽的羧基端与GCGR全长抗体的重链氨基端由肽键或接头连接。

[0075] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,其中所述GLP-1肽的羧基端与全长GCGR抗体的轻链氨基端由肽键或接头连接。

[0076] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GCGR抗体选自如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0077] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GLP-1肽是如SEQ ID NO:91所示的GLP-1A,或所述GLP-1肽在GLP-1A基础上具有Q17E、I23V、K28R和G30R中一个或多个氨基酸替代的GLP-1A肽变体。

[0078] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GLP-1肽是如SEQ ID NO:91所示的GLP-1A,或所述GLP-1肽在GLP-1A基础上具有Q17E的GLP-1A肽变体。

[0079] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GLP-1肽是如SEQ ID NO:91所示的GLP-1A,或所述GLP-1肽在GLP-1A基础上具有Q17E替代,且同时还具有I23V、K28R和G30R中一个或多个氨基酸替代GLP-1A肽变体。

[0080] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GLP-1肽是如SEQ ID NO:91所示的GLP-1A,或所述GLP-1肽在GLP-1A基础上具有Q17E或具有Q17E和I23V的GLP-1A肽变体。

[0081] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GLP-1A肽变体包含如SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98或99所示的序列或由其组成。

[0082] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述GCGR抗体是选自如前任一项所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段和如前任一项所述的GLP-1A肽或GLP-1A肽变体。

[0083] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含第一多肽链和第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:100、101、102、103、104、105、106、107和108任一所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:79所示的多肽。

[0084] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含GCGR抗体重链的第一多肽链和包含GCGR抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:109所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:81所示的多肽;

[0085] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含GCGR抗体重链的第一多肽链和包含GCGR抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:110所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:83所示的多肽;

[0086] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含GCGR抗体重链的第一多肽链和包含GCGR抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:111所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:85所示的多肽;

[0087] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含GCGR抗体重链的第一多肽链和包含GCGR抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:112所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:87所示的多肽;或者

[0088] 在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含GCGR抗体重链的第一多肽链和包含GCGR抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如SEQ ID NO:113所示的多肽,和所述第二多肽链选自如SEQ ID NO:89所示的多肽。

[0089] 另一方面,本公开还提供一种GLP-1肽变体。在一些实施方式中,所述GLP-1肽变体,其是在SEQ ID NO:91所示的GLP-1A基础上具有Q17E、I23V、K28R和G30R中一个或多个氨基酸突变的突变体。

[0090] 在一些实施方式中,所述GLP-1肽是如SEQ ID NO:91所示的GLP-1A,或所述GLP-1肽在GLP-1A基础上具有Q17E或具有Q17E和I23V的GLP-1A肽变体。

[0091] 在一些实施方式中,所述的GLP-1肽变体,其中具有如SEQ ID NO:92、93、94、95、96、97、98或99所示的序列。

[0092] 本公开还提供一种药物组合物,其含有治疗有效量的如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

[0093] 本公开还提供一种分离的核酸分子,其编码如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体。

[0094] 本公开提供一种重组载体,其包含如前所述的分离的核酸分子。

[0095] 本公开提供一种用如前所述的重组载体转化的宿主细胞,所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,优选为真核细胞,更优选哺乳动物细胞或昆虫细胞。

[0096] 本公开提供用于生产如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或根据如前所述的GLP-1肽变体的方法,所述方法包括将如前所述宿

主细胞在培养基中进行培养以形成并积累如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段或双特异性蛋白或GLP-1肽变体。

[0097] 本公开提供用于体外检测或测定人GCGR的方法,所述方法包括使用如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0098] 一种检测人GCGR的试剂盒,其包含如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0099] 根据一些实施方式,还提供了前述抗GCGR单克隆抗体或其抗原结合片段在制备医疗器械(例如试剂盒、阵列、试纸、多孔板、磁珠、包被微粒)中的用途,所述医疗器械包含前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。作为一个示例,试剂盒中包含包被有前述抗GCGR单克隆抗体或其抗原结合片段的多孔板。

[0100] 本公开提供如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于检测或测定人GCGR的试剂中的用途。

[0101] 本公开提供一种降低受试者血糖浓度的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,或如前所述的药物组合物。

[0102] 优选地,所述治疗有效量为单位剂量的组合物中含有0.1-3000mg的如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或根据如前所述的GLP-1肽变体。

[0103] 本公开提供一种治疗代谢障碍的方法,所述方法包括向受试者施用如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,或如前所述的药物组合物;优选地,所述代谢障碍为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

[0104] 本公开还提供根据如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,或如前所述的药物组合物在制备治疗代谢障碍或降低受试者血糖浓度的药物中的用途;

[0105] 优选地,所述代谢障碍为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

[0106] 本公开还提供用如前所述的抗GCGR的单克隆抗体或其抗原结合片段,或如前所述的双特异性蛋白,或如前所述的GLP-1肽变体,或如前所述的药物组合物用作药物,优选的用作治疗代谢障碍或降低受试者血糖浓度的药物。

[0107] 更优选地,所述代谢障碍为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

附图说明

[0108] 图1:本公开的双特异性蛋白(GLP-1/GCGR抗)结构示意图。

[0109] 图2:双特异性蛋白及GCGR抗体对GCGR的拮抗活性。

[0110] 图3:双特异性蛋白及度拉糖肽对GLP-1R的激活活性。

[0111] 图4:长期用药对ob/ob小鼠随机血糖的影响,Vehicle(空载体)为注射磷酸盐缓冲液(PBS)的模型对照组,hu1803-9D-3mpk与hu1803-9-2.84mpk和度拉糖肽-1.16mpk是相同物质的量浓度。

[0112] 图5:长期用药对ob/ob小鼠饥饿血糖的影响。所有实验组均能显著降低小鼠空腹血糖浓度,其中hu1803-9D-3mpk与hu1803-9-2.84mpk的降血糖浓度能力最强,且hu1803-9D-3mpk的降血糖活性优于hu1803-9-2.84mpk。

具体实施方式

[0113] 术语

[0114] 本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0115] 术语“双特异性蛋白”指能够与两个目标蛋白或目标抗原结合的蛋白分子。在本公开双特异性蛋白特指能够结合GCGR和GLP-1R(GLP-1受体),由GLP-1肽和GCGR抗体(或其抗原结合片段)的多肽链融合后形成的蛋白。

[0116] “GLP-1肽”指能结合并激活GLP-1受体的肽。现有技术的肽描述于专利申请W02008/071972、W02008/101017、W02009/155258、W02010/096052、W02010/096142、W02011/075393、W02008/152403、W02010/070251、W02010/070252、W02010/070253、W02010/070255、W02011/160630、W02011/006497、W02011/117415、W02011/117416、W02006/134340、W01997046584、W02007124461、W02017100107、W02007039140、CN1935261A、CN1935846A、W02006036834、W02005058958、W02002046227、W01999043705、W01999043708、W01999043341、CN102949730、CN104293834、CN104327187、W02015067716、W02015049651、W02014096145、W02014096148、W02014096150、W02014096149中,其内容通过引用并入本文。包括GLP-1、GLP-1类似物和GLP-1受体肽激动剂,部分具体的GLP-1肽例如:利西拉来(Lixisenatide)/AVE0010/ZP10/Lyxumia、艾塞那肽(Exenatide)/毒蜥外泌肽-4/Byetta/Bydureon/ITCA 650/AC-2993、利拉鲁肽/Victoza、索马鲁肽(Semaglutide)、他司鲁肽(Taspoglutide)、Syncria/阿必鲁肽(Albiglutide)、度拉糖肽(Dulaglutide)、rExendin-4、CJC-1134-PC、PB-1023、TTP-054、Langlenatide/HM-11260C、CM-3、GLP-1Eligen、ORMD-0901、NN-9924、NN-9926、NN-9927、Nodexen、Viador-GLP-1、CVX-096、ZYOG-1、ZYD-1、GSK-2374697、DA-3091、MAR-701、MAR709、ZP-2929、ZP-3022、TT-401、BHM-034、MOD-6030、CAM-2036、DA-15864、ARI-2651、ARI-2255、艾塞那肽-XTEN和胰高血糖素-Xten,除上述GLP-1肽外,还包括本公开基于SEQ ID NO:91所示GLP-1A及其突变体(如SEQ ID NO:92-99所示)。

[0117] GPCR(G Protein-Coupled Receptor),即G蛋白偶联受体,是表达在细胞质膜上的一类跨膜蛋白。GPCR由超过800个成员组成,是目前已知的哺乳动物基因组中最大的膜蛋白家族。在人体内,GPCR蛋白广泛分布于中枢神经系统、免疫系统、心血管、视网膜等器官和组织,参与机体的发育和正常的功能行使。

[0118] GPCR蛋白主体由7段跨细胞质膜的 α 螺旋结构构成。N端和三个环位于胞外,参与蛋白与其受体的相互作用;C端和3个环位于胞内,其中C端和第3个环在GPCR蛋白与下游G蛋白的相互作用从而介导胞内的信号传导过程中发挥重要的作用。

[0119] “GCGR”是胰高血糖素 (Glucagon) 受体,是GPCR家族的成员之一,胰高血糖素与GCGR结合后主要通过激活下游途径,加速糖原分解、脂肪分解和/或糖异生,使血糖升高。

[0120] 术语“抗体 (antibody, Ab)”包含至少一个与具体抗原 (或其表位) (例如GCGR) 特异性结合或相互作用 (例如识别和/或结合) 的互补决定区的抗原结合分子 (或分子复合物)。

[0121] 术语“抗体”包含:包括通过双硫键相互连接的四条多肽链,两条重 (H) 链和二条轻 (L) 链的免疫球蛋白分子及其多聚体 (例如IgM)。各重链包含重链可变区 (文中缩写为HCVR或VH) 和重链恒定区 (CH)。这一重链恒定区包含三个区 (结构域),CH1、CH2和CH3。各轻链包含轻链可变区 (文中缩写为LCVR或VL) 和轻链恒定区 (CL)。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区 (CDR),其间散布着较保守性区域,称为框架区 (framework region, FR, 也称骨架区、构架区)。各VH和VL是由三个CDR和四个FR所组成,以下列顺序由氨基端排列到羧基端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0122] 在本公开的不同实施例中,抗GCGR抗体 (或其抗原结合片段) 的FR可与人种序列相同,或可经自然或人工修饰。抗体可以是不同亚类 (subclass) 的抗体,例如,IgG (例如,IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4亚类)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗体。

[0123] 术语“抗体”还包含完全抗体分子的抗原结合片段。

[0124] 术语抗体的“抗原结合部分”、“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”等,如文中所用,包含任何与抗原特异性结合形成复合物的天然生成、酶制得、合成或基因工程改造的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可使用任何适合的标准技术,例如蛋白质水解消化作用或涉及编码抗体可变区和 (视需要) 恒定区的DNA操作和表达的重组基因工程技术,来源于例如全抗体分子。这一DNA是已知的和/或可容易地从例如市售来源、DNA资料库 (包含,例如噬菌体-抗体资料库) 取得或可经合成。这一DNA可用化学或通过使用分子生物技术来定序和操作,例如将一个或多个可变和/或恒定区排列成适合的配置,或导入密码子,产生半胱氨酸残基、修饰、增添或删除氨基酸等。

[0125] 抗原结合片段的非限定示例包含:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv (scFv) 分子;(vi) dAb片段。其它工程改造分子,例如区域特异性抗体、单域抗体、区域删除抗体、嵌合抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体 (例如单价纳米抗体、双价纳米抗体等)、小模块免疫医药 (SMIP) 和鲨可变IgNAR区,也涵盖在文中所用的“抗原结合片段”的词语内。

[0126] 抗原结合片段典型地将包含至少一个可变区。可变区可以是任何大小或氨基酸组成的区域且一般将包含与一个或多个框架序列相邻或在其框架内的CDR。

[0127] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段在任何可变区和恒定区的配置中,可变区和恒定区可直接彼此相连接或可通过完整或部分的绞链或连接子区相连接。绞链区可由至少2个 (例如5、10、15、20、40、60或更多个) 氨基酸所组成,使得在单一多肽分子中在相邻的可变和/或恒定区之间产生柔性和半柔性连结。

[0128] “鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的来源于小鼠或大鼠的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤,当所注射的试验对象为小鼠时,所产生的抗体为小鼠来源抗体,当所注射的试验对象为大鼠时,所产生的抗体为大鼠来源抗体。

[0129] “嵌合抗体 (chimeric antibody)”,是将第一物种 (如鼠) 抗体的可变区与第二物

种(如人)抗体的恒定区融合而成的抗体。建立嵌合抗体,要先建立分泌第一物种(如鼠)单抗的杂交瘤,然后从杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆第二物种(如人)抗体的恒定区基因,将第一物种可变区基因与第二物种恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中,最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。

[0130] 在本公开一个优选的实施方案中,所述的嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区,或者使用氨基酸突变(如YTE突变或回复突变,L234A和/或L235A突变,或S228P突变)的IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区变体。

[0131] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,包括CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将动物来源抗体,例如鼠源抗体的CDR序列移植到人的抗体可变区框架区(或构架区,framework region)中产生的抗体。人源化抗体可以克服嵌合抗体由于携带大量异源蛋白成分,从而诱导的异源性反应。此类框架区的序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(在因特网<http://www.vbase2.org/>获得),以及在Kabat, E.A.等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版中找到。

[0132] 为避免免疫原性下降引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少的反向突变或回复突变,以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对CDR进行亲和力成熟后的人源化抗体。

[0133] 由于抗原的接触残基,CDR的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以可能是体细胞高度突变的结果。因此,可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查动物单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR供体构架中与种系不同的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系,那么可将序列与亚类共有序列或具有高相似性百分数的动物抗体序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果,从而在结合中起着重要作用。

[0134] 在本公开一个的实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,可进一步包含人源或鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含人源或鼠源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。

[0135] 人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体,示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区变体,具体替换如现有技术已知的YTE突变,L234A和/或L235A突变,或S228P突变,或获得knob-into-hole结构的突变(使得抗体重链具有knob-Fc和hole-Fc组合),这些突变已被证实使得抗体具有新的性能,但不改变抗体可变区的功能。

[0136] “人抗体”与“人源抗体”可以互换使用,可以是源于人的抗体或者是从一种转基因生物体中获得的抗体,该转基因生物体经“改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人抗体并且可以通过本领域已知的任何方法产生。在某些技术中,将人重链和轻链基因座的元件引入到源于胚胎干细胞系的生物体的细胞株中,这些细胞株中的内源性重链和轻链基因座被

靶向破坏。转基因生物可以合成对人抗原特异的人抗体,并且该生物可以用于产生人抗体-分泌杂交瘤。人抗体还可以是一种抗体,其中重链和轻链是由源于一个或多个人DNA来源的核苷酸序列编码的。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建,或者由体外活化的B细胞构建,所有的这些都是本领域已知的。

[0137] “单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变,这些变体通常以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体识别相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物(制剂)的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此,修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如,根据本公开使用的单克隆抗体可通过各种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。术语“单克隆抗体或其抗原结合片段”中单克隆抗体指全长抗体。

[0138] 术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指重链由氨基端至羧基端依次包含VH区、CH1区、铰链区和Fc区,轻链由氨基端至羧基端依次包含VL区和CL区的抗体。

[0139] 此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但可使用重组方法,通过合成的接头连接它们,从而使得其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人(1988) Science 242:423-426;和Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段,并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选的片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。

[0140] 抗原结合片段还可并入至包含一对串联Fv片段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,该对串联Fv片段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062;及美国专利US5641870)。

[0141] Fab是通过用木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的具有约50,000Da分子量的抗体片段,其具有抗原结合活性,其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

[0142] F(ab')₂是通过用胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000Da的抗体片段,并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区。

[0143] Fab'是通过切割上述F(ab')₂的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000Da并具有抗原结合活性的抗体片段。Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理特异性识别并结合抗原的F(ab')₂来生产。

[0144] 此外,可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

[0145] 术语“单链抗体”、“单链Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域;VH)和抗体轻链可变结构域(或区域;VL)的分子。此类scFv分子可具有一般结构: NH_2 -VL-接头-VH-COOH或 NH_2 -VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成,例如使用1-4个(包括1个、2个、3个或4个)重复的变体(Holliger等人(1993),Proc Natl Acad Sci USA.90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur J Immuno.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J Mol Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol Immunother.50:51-59描述。

[0146] “Linker”或“接头”或“连接子”指用于连接蛋白质结构域的连接性多肽序列,通常具有一定的柔性,接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。

[0147] 双抗体(diabody)是指scFv被二聚体化的抗体片段,是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中,两个抗原可以是相同或不同的。

[0148] dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法(Protein Engineering.7:697(1994))基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

[0149] 本公开一些实施例中抗原结合片段可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别并结合抗原的单克隆抗体的VH和/或VL及所需的其他结构域的编码cDNA,构建编码抗原结合片段的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达抗原结合片段。

[0150] “Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能变化,但人IgG重链Fc区通常被定义成从位置Cys226上的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基端。Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991。免疫球蛋白的Fc区通常具有两个恒定区结构域CH2和CH3。

[0151] “knob-Fc”指在抗体Fc区包含T366W的点突变,以形成类似knob的空间结构。相应地,“hole-Fc”指在抗体Fc区包含T366S,L368A,Y407V的点突变,以形成类似hole的空间结构。Knob-Fc和hole-Fc由于空间位阻的原因,更易形成异二聚体。为进一步地促进异二聚体的形成,还可在knob-Fc和hole-Fc分别引入S354C和Y349C的点突变,通过二硫键进一步促进异二聚体的形成。同时,为消除或减弱抗体Fc引起的ADCC效应,还可向Fc引入的234A和235A的取代突变。在双特异性抗体中,knob-Fc或hole-Fc既可以作为第一多肽链的Fc区域,也可以作为第二多肽链的Fc区域,在同一双特异性抗体中,第一多肽链和第二多肽链的Fc区不同时为knob-Fc或hole-Fc。

[0152] 术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽,变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变,包括在原蛋白质或多肽的基础上发生1个或数个氨基酸的插入、缺失或替换。

[0153] 抗体的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链的可变区(VL)或抗体重链的可变区(VH)。如在本领域中已知的,重链和轻链的可变区各自自由通过3个互补决定区(CDR)(也称

为高变区)连接的4个框架区(FR)组成。每一条链中的CDR通过FR紧密地保持在一起并且与来自另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合部位的形成。存在至少2个用于确定CDR的技术:(1)基于跨种序列变异性的方法(即,Kabat等Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda MD));和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-Lazikani等,J.Molec.Biol.273:927-948(1997))。如本文中所用,CDR可指由任一方法或由两种方法的组合确定的CDR。

[0154] 术语“抗体框架”或“FR区”,是指可变结构域VL或VH的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有CDR的可变结构域。

[0155] 术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。通常,每个重链可变区中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)和每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定CDR的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则(参见Kabat等(1991)“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)、“Chothia”编号规则(Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273:927-948)和ImMunoGenTics(IMG)编号规则(Lefranc M.P.,Immunologist,7,132-136(1999);Lefranc,M.P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003))等。例如,对于经典格式,遵循Kabat规则,所述重链可变域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。遵循Chothia规则,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);并且VL中的氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)。通过组合Kabat和Chothia两者的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)和人VL中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)构成。遵循IMG规则,VH中的CDR氨基酸残基编号大致为26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和93-102(CDR3),VL中的CDR氨基酸残基编号大致为27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和89-97(CDR3)。遵循IMG规则,抗体的CDR区可以使用程序IMG/DomainGap Align确定。

[0156] “HCDR1、HCDR2和HCDR3区或其任意CDR变体”中的“其任意CDR变体”是指对HCDR1、HCDR2和HCDR3区中任意一个、或两个、或三个HCDR进行氨基酸突变获得的变体。

[0157] “抗体恒定区结构域”指来源于抗体的轻链和重链的恒定区的结构域,包括CL和来源于不同类抗体的CH1、CH2、CH3和CH4结构域。

[0158] “表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。

[0159] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于 10^{-8} M,例如大约小于 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的亲和力(KD)结合。

[0160] 当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和

抗体)的情况中时,意指在抗原结合蛋白之间竞争,其通过以下测定法来测定:在所述测定法中,待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争,这些测定例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如Stahli等,1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见例如Kirkland等,1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如Harlow和Lane,1988, *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体,实验室手册), Cold Spring Harbor Press);用I-125标记物的固相直接标记RIA(参见例如Morel等,1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(参见例如Cheung,等,1990, *Virology* 176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等,1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)。通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原(所述抗原在固态表面或细胞表面)。在待测抗原结合蛋白存在下,测量结合于固态表面或细胞的标记的量,来测量竞争性抑制。通常,待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括:结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白;和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白,所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本公开实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时,其将抑制(例如降低)至少40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下,结合被抑制至少80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或97%或更多。

[0161] 术语“亲和力”是指在单一表位处,抗体与抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱非共价力与抗原在多个氨基酸位点处相互作用;相互作用愈大,亲和力愈强。如本文所用,抗体或其抗原结合片段(例如Fab片段)的术语“高亲和力”通常是指具有 $1\text{E}^{-9}\text{M}$ 或更小的 K_D (例如 $1\text{E}^{-10}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-11}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-12}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-13}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-14}\text{M}$ 或更小的 K_D 等)的抗体或抗原结合片段。

[0162] 术语“KD”或“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,抗体以小于大约 $1\text{E}^{-8}\text{M}$,例如小于大约 $1\text{E}^{-9}\text{M}$ 、 $1\text{E}^{-10}\text{M}$ 或 $1\text{E}^{-11}\text{M}$ 或更小的解离平衡常数(KD)结合抗原,例如,如使用表面等离子体共振(SPR)技术在BIACORE仪中测定的。KD值越小,亲和力越大。

[0163] 术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0164] 术语“载体”意指能够递送一个或多个目标基因或序列并且优选在宿主细胞中表达其的构建体。载体的示例包括,但不限于,病毒载体、裸露DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体和某些真核生物细胞诸如生产细胞。

[0165] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。例如,鼠可以用抗原或其片段免疫,所得到的抗体能被复性、纯化,并

且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。本公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从网站<http://www.imgt.org/>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351上获得。

[0166] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)、HEK293细胞(非限制性实施例如HEK293E细胞)和NS0细胞。

[0167] 工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种可选的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的高度保守N端位点。通过表达与抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲液的蛋白A或蛋白G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0168] “施用”、“给药”、“给予”、“处理”,当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指将外源性药物、治疗剂、诊断剂、组合物或者人为操作(比如实施例中的“安乐死”)提供给与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0169] “治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂,例如包含本公开实施例的任一种化合物的组合物,所述受试者具(或疑似患有、或易感于)有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床有测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如受试者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)可能无法在缓解每个目标疾病症状方面都有效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

[0170] “氨基酸保守修饰”或“氨基酸保守取代”指蛋白质或多肽中的氨基酸被具有相似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸取代,从而使得在不改变蛋白质或多肽的生物活性或其他所需特性(例如抗原亲和力和/或特异性)的情况下,可以经常进行改变。本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性(参见,例如,Watson等人,(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第224页(第4版))。此外,结构上或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。示例性氨基酸保守取代如下:

	原始残基	保守取代
	Ala (A)	Gly; Ser
	Arg (R)	Lys; His
	Asn (N)	Gln; His; Asp
	Asp (D)	Glu; Asn
	Cys (C)	Ser; Ala; Val
	Gln (Q)	Asn; Glu
	Glu (E)	Asp; Gln
[0171]	Gly (G)	Ala
	His (H)	Asn; Gln
	Ile (I)	Leu; Val
	Leu (L)	Ile; Val
	Lys (K)	Arg; His
	Met (M)	Leu; Ile; Tyr
	Phe (F)	Tyr; Met; Leu
	Pro (P)	Ala
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
[0172]	Trp (W)	Tyr; Phe
	Tyr (Y)	Trp; Phe
	Val (V)	Ile; Leu。

[0173] “有效量”、“有效剂量”是指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途,有益的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作,包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用,有益的结果包括临床结果,如减少各种本公开靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或多个症状,减少治疗病症所需的其它药剂的剂量,增强另一种药剂的疗效,和/或延缓受试者的本公开靶抗原相关病症的进展。

[0174] “外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。

[0175] “内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

[0176] “同源性”、“同一性”在本文中可以互换,是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如如果两个DNA分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$

的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的10个位置有6个匹配或同源,那么两个序列为60%同源;如果两个序列中的100个位置有95个匹配或同源,那么两个序列为95%同源。通常,当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如,可以通过BLAST算法执行比较,其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。

[0177] 以下参考文献涉及经常用于序列分析的BLAST算法:BLAST算法(BLAST ALGORITHMS):Altschul,S.F.等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-410;Gish,W.等人,(1993)Nature Genet.3:266-272;Madden,T.L.等人,(1996)Meth.Enzymol.266:131-141;Altschul,S.F.等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Zhang,J.等人,(1997)Genome Res.7:649-656。其他如NCBI BLAST提供的常规BLAST算法也为本领域技术人员所熟知。

[0178] “分离的”指加以改为“脱离其原始存在环境状态”,并且在这种情况下意味着,指定的分子基本上不含其他非目标生物分子。通常,术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

[0179] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

[0180] “药物组合物”表示含有一种或多种本公开所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0181] 术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送抗体或抗原结合片段的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂(如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂)、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)右旋糖、植物油(例如橄榄油)、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

[0182] 术语“代谢障碍”的具体示例为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

[0183] 此外,本公开另一方面涉及用于免疫检测或测定目标抗原的方法、用于免疫检测或测定目标抗原的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原的细胞的方法和用于诊断与目标抗原阳性细胞相关的疾病的诊断剂,其包含本公开的特异性识别并结合目标抗原的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

[0184] 在本公开中,用于检测或测定目标抗原的量的方法可以是任何已知方法。例如,它包括免疫检测或测定方法。

[0185] 免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的示例包括放射性物质标记的免疫抗体方法(RIA)、酶免疫测定法(EIA或ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

[0186] 上述与目标抗原阳性细胞相关的疾病可以通过用本公开的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达目标抗原的细胞来诊断。

[0187] 为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,可以使用利用FMAT8100HTS系统(Applied Biosystem)的荧光抗体染色法等。

[0188] 在本公开中,对用于检测或测定目标抗原的活体样本没有特别限制,只要它具有包含表达目标抗原的细胞的可能性即可,例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

[0189] 根据所需的诊断方法,含有本公开的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂,例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

[0190] 在以上说明书中提出了本发明一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本发明,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本发明的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入本文。提出以下实施例是为了更全面地说明本发明的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本发明的范围,本发明的范围由权利要求书限定。

[0191] 实施例

[0192] 实施例1:GCGR抗原抗体的制备

[0193] 1.1抗原构建和筛选

[0194] 将编码全长477个氨基酸的胰高血糖素受体的人类GCGR cDNA亚克隆到表达载体(如pcDNA3.1)中,并转染CHO-K1细胞。在筛选和单细胞克隆后,选择单克隆用于抗原的表达、及基于受体的细胞表面表达的特性研究。以下GCGR抗原未特殊说明的均指人GCGR。

[0195] 全长GCGR:用于构建GCGR过表达细胞株,或用于免疫用抗原及后续检测:

[0196] MPCCQPQRPLLLLLLLACQPQVPSAQMDFLFEKWKLYGDQCHHNSLLPPPTELVCNRTFDKYSCW
PDTPTANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGPDGQWVRGPRGQPWRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSSFQVM
YTVGYSLSLGALLLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFASFVLKASSVLVIDGLLRTRYSKIGDDLSVSTWLSGDA
VAGCRVAAVFMQYGIVANYCWLLVEGLYLHNLLGLATLPERSFFSLYLIGWGAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWT
SNDNMGFWWILRFPVFLAILINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRLAKSTLTLLIPLLGVHEVVFAFVTDEH
AQGTLSAKLFFDLFLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELRRRWHRWRLGKVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKEL
QFGRGGGSQDSSAETPLAGGLPRLAESPF (SEQ ID NO:1)

[0197] 1.2GCGR杂交瘤、重组抗体的纯化

[0198] (1)杂交瘤上清分离纯化/ProteinG亲和层析:

[0199] 对于小鼠杂交瘤上清纯化首选ProteinG进行亲和层析,将培养所得杂交瘤离心取上清,根据上清体积加入10-15%体积的1M Tris-HCl (pH8.0-8.5)调节上清pH。ProteinG柱利用6M盐酸胍洗3-5倍柱体积,然后利用纯水清洗3-5倍柱体积;利用如1×PBS (pH7.4)缓冲

体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡3-5倍柱体积;细胞上清利用低流速上样结合,控制流速使保留时间约1min或更长时间;利用1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱3-5倍柱体积至紫外吸收回落至基线;利用0.1M醋酸/醋酸钠 (pH3.0) 缓冲液进行样本洗脱,根据紫外检测收集洗脱峰,洗脱产物利用1MTris-HCl (pH8.0) 快速调节pH至5-6暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换,如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系,或者利用分子排阻如G-25脱盐替换成所需的缓冲体系,或者利用如Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样本纯度。

[0200] (2) Protein A亲和层析提取带Fc标签的双特异性蛋白或者抗体:

[0201] 首先将表达Fc双特异性蛋白或者抗体的细胞培养上清进行高速离心收取上清。ProteinA亲和柱利用6M盐酸胍洗3-5倍柱体积,然后利用纯水清洗3-5倍柱体积。利用如1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡3-5倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合,控制流速使保留时间约1min或更长时间,结合完毕后利用1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱3-5倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用0.1M醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样本洗脱,根据紫外检测收集洗脱峰,洗脱产物利用1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节pH至5-6暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换,如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系,或者利用分子排阻如G-25脱盐替换成所需的缓冲体系,或者利用如Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样本纯度。

[0202] 实施例2:抗人GCGR单克隆抗体的制备

[0203] 2.1免疫

[0204] (1) 小鼠免疫:抗人GCGR单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用SJL白小鼠,雌性,6-8周龄(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001)。饲养环境:SPF级。小鼠购进后,实验室环境饲养1周,12/12小时光/暗周期调节,温度20-25℃;湿度40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为GCGR CHO-K1稳转细胞。

[0205] 免疫方案:用佐剂TiterMax®Gold Adjuvant (Sigma Cat No.T2684) 预先免疫小鼠,腹膜内(IP)注射0.1ml/只(首次免疫)。15min后,腹膜内(IP)注射GCGR CHO-K1稳转细胞,1E7细胞/只。接种时间为第0、14、28、42、56、70、84、98、112天。于第35、63、91天取血,用ELISA方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第6-9次免疫以后,选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前3天加强免疫,腹膜内(IP)注射1E7细胞/只的GCGR CHO-K1稳转细胞。

[0206] (2) 大鼠免疫:使用DNA(编码全长hGCGR,编码序列参见Genbank登录号:NM_000160)免疫6-8周龄SD大鼠,用FACS方法确定大鼠血清中的抗体滴度。在第3-4次免疫以后,选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的大鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前3天加强免疫。

[0207] 2.2脾细胞融合

[0208] 采用优化的PEG介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0细胞(ATCC®CRL-8287™)进行融合得到杂交瘤细胞。融合的杂交瘤细胞以0.5-1E6/ml的密度用完全培养基(含20% FBS、1×HAT、1×OPI的IMEM培养基)重悬,100μl/孔种于96孔板中,37℃,5%CO₂

孵育3-4天后,补充HAT完全培养基100 μ l/孔,继续培养3-4天至形成克隆。去除上清,加入200 μ l/孔的HT完全培养基(含20%FBS、1 $\times$ HT和1 $\times$ OPI的IMDM培养基),37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养3天后进行ELISA检测。

[0209] 2.3杂交瘤细胞筛选

[0210] 根据杂交瘤细胞生长密度,用细胞结合ELISA方法进行杂交瘤培养上清检测。将测试呈为阳性的孔细胞及时进行扩增、冻存、和二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

[0211] 每次亚克隆细胞也均需进行GCGR细胞结合ELISA实验检测。通过实验筛选得到杂交瘤克隆,用无血清细胞培养法进一步制备抗体,按纯化实例纯化抗体,供在测试例中使用。

[0212] 2.4杂交瘤阳性克隆序列测定

[0213] 从阳性杂交瘤中克隆序列过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞,用Trizol (Invitrogen, Cat No.15596-018)按照试剂盒说明书步骤提取RNA,用PrimeScriptTM Reverse Transcriptase试剂盒反转录(Takara, Cat No.2680A)。将反转录得到的cDNA采用小鼠Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503)进行PCR扩增后测序。

[0214] 从得到的DNA序列获得所筛选到的阳性克隆,用无血清细胞培养法制备抗体,按纯化实例纯化抗体,在测试例中使用基于细胞的GCGR结合阻断实验经过多轮筛选,得到来源于小鼠的杂交瘤克隆1803,1805,1808和1810,来源于大鼠的杂交瘤克隆1817和1822。

[0215] 表1.GCGR抗体轻链可变区和重链可变区序列

抗体名称	重链可变区 (SEQ ID NO)	轻链可变区 (SEQ ID NO)
m1803	QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKAT GYTFTDYWIEWVKQRPGLGLEWIG EILPGSTYTNYNEKFKGRATFTAEPS SSSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLS TLMAVDYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 2)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIN CRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYSSSTLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISHLEQEDIATYFCQ QTNIFPWTFGGGKLEI (SEQ ID NO: 3)
m1805	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSG YTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSI DPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDVAVYYCTRDYY GSSSWFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 4)	DVVMQSPATLSVTPGDRVSL CRASQSIDYLHWYQQKSHESP RLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSG SDFTLSINSVEPEDVGVYYCQN GHSFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 5)
m1808	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKAS GDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGEI	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNYLNWYQQKPDGTV

[0217]		YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSS TTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITS VIGADYFDYWGGQTTLTVSS (SEQ ID NO: 6)	KLLIYYSSTLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGNTFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)
	m1810	QVQLQQSGTELARPGTSVTLSCKAS GYTFTNYAISWVKQRTGQGLEWIGE IYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRS SKTMYMELRSLTSVDSAVYFCASGV ITTVVSTDYFDYWGGQSPLTVSS (SEQ ID NO: 8)	DIQMTQIPSSLSVSLGDRVTISC RASLDISNYLNWYQLKPDGTV KLLIYYTSTLHSGVSSRFSGSGS GTEYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNMVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)
	rat1817	EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVA SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN KNNLYLQMDSLRSEETATYYCARH TTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTS S (SEQ ID NO: 10)	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE SSGDIGDSYVNWYQQHLGRPP LNVIIYADVQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQMDDEADY FCQSYDTNIDIIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 11)
	rat1822	EVLVESGGDFVQPGRSVKLSCAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVG SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN ESTLYLQMDSLRSEETATYYCARHT TPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTS S (SEQ ID NO: 12)	QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE RSSGDIGESYVNWYQQHLGRP PINVIYADDQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQVDDEADY FCQSYDSSIDIFFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 13)

[0218] 表2.Kabat编号的CDR区序列

抗体名称	重链CDR		轻链CDR	
m1803	HCDR1	<u>DYWIE</u> (SEQ ID NO: 14)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 17)
	HCDR2	<u>EILPGSTYTNYYNEKFKG</u> (SEQ ID NO: 15)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (SEQ ID NO: 18)
	HCDR3	<u>GLSTLMAVDYFDY</u> (SEQ ID NO: 16)	LCDR3	<u>QQTNI FPWT</u> (SEQ ID NO: 19)
m1805	HCDR1	<u>DYNMD</u> (SEQ ID NO: 20)	LCDR1	<u>RASQSISDYLH</u> (SEQ ID NO: 23)
	HCDR2	<u>SIDPDNGGTIYNQKFKG</u> (SEQ ID NO: 21)	LCDR2	<u>YASQSIS</u> (SEQ ID NO: 24)
	HCDR3	<u>DYYGSSSWFAY</u> (SEQ ID NO: 22)	LCDR3	<u>QNGHSFPYT</u> (SEQ ID NO: 25)
m1808	HCDR1	<u>TNGIS</u> (SEQ ID NO: 26)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 29)
	HCDR2	<u>EIYPRSGNTYYNENFKG</u> (SEQ ID NO: 27)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (SEQ ID NO: 30)
	HCDR3	<u>SITSVIGADYFDY</u> (SEQ ID NO: 28)	LCDR3	<u>QQGNTFPWT</u> (SEQ ID NO: 31)
m1810	HCDR1	<u>NYAIS</u> (SEQ ID NO: 32)	LCDR1	<u>RASLDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 35)
	HCDR2	<u>EIYPTSGNTYYNEKFKG</u>	LCDR2	<u>YTSTLHS</u>

[0220]

		(SEQ ID NO: 33)		(SEQ ID NO: 36)
	HCDR3	<u>GVITTVVSTDYFDY</u> (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	<u>QQGNMVPYT</u> (SEQ ID NO: 37)
rat1817	HCDR1	<u>NYDMA</u> (SEQ ID NO: 38)	LCDR1	<u>ERSSGDIGDSYVN</u> (SEQ ID NO: 41)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (SEQ ID NO: 39)	LCDR2	<u>ADVQRPS</u> (SEQ ID NO: 42)
	HCDR3	<u>HTTADYFYGIYFALDA</u> (SEQ ID NO: 40)	LCDR3	<u>QSYDTNIDII</u> (SEQ ID NO: 43)
rat1822	HCDR1	<u>NYDMA</u> (SEQ ID NO: 38)	LCDR1	<u>ERSSGDIGESYVN</u> (SEQ ID NO: 45)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (SEQ ID NO: 39)	LCDR2	<u>ADDQRPS</u> (SEQ ID NO: 46)
	HCDR3	<u>HTTPDYHYGIYFAMDA</u> (SEQ ID NO: 44)	LCDR3	<u>QSYDSSIDIF</u> (SEQ ID NO: 47)

[0221] 经序列比对及计算机模拟发现,上述小鼠来源抗体m1803、m1805、m1808和m1810的轻重链CDR序列具有较高的同源性,大鼠来源抗体rat1817和rat1822的轻重链CDR序列具有较高的同源性,其共有序列如下表所示:

[0222] 表3.重链及轻链CDR区序列的共有序列

[0223]

	重链CDR	轻链CDR
小鼠来源抗体	HCDR1 X ₁ X ₂ X ₃ IX ₄ , 其中 X ₁ X ₂ X ₃ 选自 DYW、TNG 或 NYA, X ₄ 选自 E/S (SEQ ID NO: 48)	LCDR1 RASX ₁₇ DISNYLN, 其中 X ₁₇ 选自 L/Q, (SEQ ID NO: 51)
	HCDR2 EIX ₅ PX ₆ SX ₇ X ₈ TX ₉ YNEX ₃₁ FKG, 其中 X ₅ 选自 L/Y, X ₆ 选自 G/R/T, X ₇ 选自 T/G, X ₈ 选自 N/Y, X ₉ 选自 N/Y, X ₃₁ 选自 K 或 N (SEQ ID NO: 49)	LCDR2 YX ₁₈ STLHS, 其中 X ₁₈ 选自 S/T (SEQ ID NO: 52)
	HCDR3 X ₃₁ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ DYFDY, 其中 X ₁₀ 选自 I/L/VI, X ₁₁ 选自 S/T, X ₁₂ 选自 S/T, X ₁₃ 选自 L/V, X ₁₄ 选自 M/V/I, X ₁₅ 选自 S/G/A, X ₁₆ 选自 T/A/V, X ₃₁ 选自 G 或 S。 (SEQ ID NO: 50)	LCDR3 QQX ₁₉ NX ₂₀ X ₂₁ PX ₂₂ T, 其中 X ₁₉ 选自 T/G, X ₂₀ 选自 M/T/I, X ₂₁ 选自 F/V, X ₂₂ 选自 W/Y (SEQ ID NO: 53)
大鼠来源抗体	HCDR1 NYDMA (SEQ ID NO: 38)	LCDR1 ERSSGDIGX ₂₆ SYVN, 其中 X ₂₆ 选自 E/D (SEQ ID NO: 55)
	HCDR2 SISTGGVNTYYRDSVKG (SEQ ID NO: 39)	LCDR2 ADX ₂₇ QRPS, 其中 X ₂₇ 选自 D/V (SEQ ID NO: 56)

[0224]	HCDR3	HTTX ₂₃ DYX ₂₄ YGIYFAX ₂₅ DA, 其中 X ₂₃ 选自 P/A, X ₂₄ 选自 F/H, X ₂₅ 选自 L/M (SEQ ID NO: 54)	LCDR3	QSYDX ₂₈ X ₂₉ IDIX ₃₀ , 其中 X ₂₈ 选自 S/T, X ₂₉ 选自 S/N, X ₃₀ 选自 F/I (SEQ ID NO: 57)
--------	-------	--	-------	--

[0225] 实施例3:鼠源抗人GCGR抗体的人源化

[0226] 使用MOE软件,比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库,分别挑选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板。将鼠源抗体的CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。根据需要,将骨架序列中部分氨基酸回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸,即得到人源化抗GCGR单克隆抗体。其中CDR区氨基酸残基的确定由Kabat编号系统确定并注释。

[0227] 上述鼠源抗体的轻重链可变区与人源抗体的轻重链恒定区连接后形成嵌合抗体,1803号克隆对应的嵌合抗体命名为ch1803,其他抗体类推。

[0228] 3.1杂交瘤克隆1803的人源化

[0229] (1) 杂交瘤克隆1803人源化构架选择:

[0230] 鼠源抗体m1803的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-3*01和hjh6.1,人源化可变区序列如下:

[0231] hu1803VH-CDR嫁接: (SEQ ID NO:61)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL

[0232] PGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS;

[0233] hu1803VL-CDR嫁接: (SEQ ID NO:58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYSSSTL

[0234] HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK;

[0235] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0236] (2) 杂交瘤克隆1803号的人源化模板选择和回复突变设计如下表:

[0237] 表4. 模板选择和回复突变

	hu1803_VL	hu1803_VH
	hu1803_VL.1 嫁接	hu1803_VH.1 嫁接
[0238]	hu1803_VL.1A K42G、 P44V、 F71Y、 Y87F	hu1803_VH.1A M69F、 R71A、 V78A
	hu1803_VL.1B P44V、 F71Y	hu1803_VH.1B M48I、 V67A、 M69F、 R71A、 V78A、 A93S
		hu1803_VH.1C R38K、 M48I、 V67A、 M69F、
[0239]		R71A、 T73P、 V78A、 A93S

[0240] 注:如P44V表示依照Kabat编号系统,将Kabat编号的第44位P突变回V。嫁接代表鼠抗体CDR直接植入人种系FR区序列。

[0241] (3) 杂交瘤克隆1803的人源化具体序列如下:

[0242] >hu1803_VL.1 (同Hu1803VL-CDR嫁接): (SEQ ID NO:58)

[0243] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

[0244] >hu1803_VL.1A: (SEQ ID NO:59)

[0245] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGGAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

[0246] >hu1803_VL.1B: (SEQ ID NO:60)

[0247] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

[0248] >hu1803_VH.1 (同Hu1803VH-CDR嫁接): (SEQ ID NO:61)

[0249] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

[0250] >hu1803_VH.1A: (SEQ ID NO:62)

[0251] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTFTADTSTSTAYMESSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

[0252] >hu1803_VH.1B: (SEQ ID NO:63)

[0253] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADTSTSTAYMESSLRSED TAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS

[0254] >hu1803_VH.1C: (SEQ ID NO:64)

[0255] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVKQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADPSTSTAYMESSLRSED TAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS。

[0256] (4) 杂交瘤克隆1803来源抗体的人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列组合如下:

[0257] 表5. 不同人源化抗体轻重链可变区组合

[0258]

	hu1803_VL.1	hu1803_VL.1A	hu1803_VL.1B
hu1803_VH.1	hu1803-1	hu1803-5	hu1803-9
hu1803_VH.1A	hu1803-2	hu1803-6	hu1803-10
hu1803_VH.1B	hu1803-3	hu1803-7	hu1803-11
hu1803_VH.1C	hu1803-4	hu1803-8	hu1803-12

[0259] 上表中抗体名称所指代的抗体轻重链可变区可以分别与抗体轻重链恒定区连接形成全长抗体。在本公开中如无明确说明时,形成全长抗体时轻链可变区与SEQ ID NO:73所示的Kappa链恒定区连接形成抗体轻链,重链可变区与SEQ ID NO:72所示的IgG4-AA连接形成抗体重链。

[0260] 3.2杂交瘤克隆1810的人源化

[0261] (1) 杂交瘤克隆1810人源化构架选择:

[0262] 鼠源抗体m1810的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hJK4.1,人源化重链模板为IGHV1-69*02和hJH4.1,人源化可变区序列如下:

[0263] Hu1810VH-CDR嫁接: (SEQ ID NO:68)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY

[0264] PTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGLVTVSS

[0265] Hu1810VL-CDR嫁接: (SEQ ID NO:65)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTTSTL

[0266] HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGGTKVEIK

[0267] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0268] (2) 杂交瘤克隆1810号的人源化模板选择和回复突变设计如下表:

[0269] 表6. 模板选择和回复突变

hu1810_VL		hu1810_VH	
hu1810_VL.1	嫁接	hu1810_VH.1	嫁接
hu1810_VL.1A	P44V, P59S, F71Y	hu1810_VH.1A	K73R, A78M, R94S
hu1810_VL.1B	Q38L, P44V, P59S, D70E, F71Y	hu1810_VH.1B	M48I, V67A,I69L, K73R, A78M, R94S
		hu1810_VH.1C	R38K, M48I, R66K, V67A,I69L, K73R, A78M, R94S

[0271] 注:如P44V表示依照Kabat编号系统,将Kabat编号的第44位P突变回V。嫁接代表鼠抗体CDR直接植入人种系FR区序列。

[0272] (3) 杂交瘤克隆1810的人源化具体序列如下:

[0273] >hu1810_VL.1 (同Hu1810VL-CDR嫁接): (SEQ ID NO:65)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTTSTL

[0274] HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGGTKVEIK

[0275] >hu1810_VL.1A: (SEQ ID NO:66)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYTTSTL

[0276] HSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGGTKVEIK

[0277] >hu1810_VL.1B: (SEQ ID NO:67)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYTTSTL

[0278] HSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGGTKVEIK

[0279] >hu1810_VH.1 (同Hu1810VH-CDR嫁接): (SEQ ID NO:68)

[0280] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLVTVSS

[0281] >hu1810_VH.1A: (SEQ ID NO:69)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
[0282] PTSGNTYYNEKFKGRVTITADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLVTVSS

[0283] >hu1810_VH.1B: (SEQ ID NO:70)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWIGEIYP
[0284] TSGNTYYNEKFKGRATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS

[0285] >hu1810_VH.1C: (SEQ ID NO:71)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYP
[0286] TSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS。

[0287] (4) 杂交瘤克隆1810的人源化抗体轻重链可变区序列组合如下:

[0288] 表7. 不同人源化抗体轻重链可变区的组合

[0289]

	hu1810_VL.1	hu1810_VL.1A	hu1810_VL.1B
hu1810_VH.1	hu1810-1	hu1810-5	hu1810-9
hu1810_VH.1A	hu1810-2	hu1810-6	hu1810-10
hu1810_VH.1B	hu1810-3	hu1810-7	hu1810-11
hu1810_VH.1C	hu1810-4	hu1810-8	hu1810-12

[0290] 上表中抗体名称所指代的抗体轻重链可变区可以分别与抗体轻重链恒定区连接形成全长抗体,在本公开中如无明确说明时,形成全长抗体时轻链可变区与SEQ ID NO:73所示的Kappa链恒定区连接形成抗体轻链,重链可变区与SEQ ID NO:72所示的IgG4-AA连接形成抗体重链。

[0291] 实施例4:构建和表达GCGR嵌合体/人源化抗体的IgG4-AA形式

[0292] 设计引物,PCR搭建各嵌合体/人源化抗体VH/VK基因片段,再与表达载体pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组,构建抗体全长表达载体VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。IgG4-AA抗体形式可以通过IgG4抗体形式简单点突变获得,IgG4-AA代表F234A、L235A和S228P突变。F234A和L235A的突变可降低IgG4-Fc与Fc γ R的结合能力,进一步降低ADCC/CDC,S228P代表野生型IgG4铰链区第228位的氨基酸S突变成P,该位点突变能够避免天然IgG4抗体在体内发生Fab-交换(exchange)导致的错配。

[0293] ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817和ch1822为表1所示动物来源的轻重链可变区分别与人抗体kappa链和人抗体IgG4-AA重链恒定区连接后形成的嵌合抗体。

[0294] IgG4-AA的重链恒定区序列如下:(SEQ ID NO:72)

[0295] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0296] 抗体的轻链 (Kappa链) 恒定区序列如下: (SEQ ID NO:73)

[0297] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0298] 构建后的抗体序列示例性列举如下:

[0299] ch1803:抗体形式IgG4AA

[0300] ch1803重链序列: (SEQ ID NO:74)

[0301] QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKATGYFTDYWIEWVKRPGHGLEWIGEILPGSTYTNNEKFKGRA TFTAEPSSSSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLSTLMAVDYFDYWGGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0302] ch1803轻链序列: (SEQ ID NO:75)

[0303] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTINCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISHLEQEDIATYFCQQTNIFPWTGGGKLEIRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0304] hu1803-1:抗体形式IgG4AA

[0305] hu1803-1重链序列: (SEQ ID NO:76)

[0306] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNNEKFKGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0307] hu1803-1轻链序列: (SEQ ID NO:77)

[0308] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSG TDFTLTITSSLPEDFATYYCQQTNIFPWTGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0309] hu1803-9重链序列: (SEQ ID NO:78)

[0310] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNNEKFKGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0311] hu1803-9轻链序列: (SEQ ID NO:79)

[0312] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0313] ch1805重链序列: (SEQ ID NO:80)

[0314] EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSIDPDNGGTIYNQKFKGKALTVDKSSSTAYMELRSLTSED~~TAVYYCTR~~DYGGSSWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTKYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0315] ch1805轻链序列: (SEQ ID NO:81)

[0316] DVVMTQSPATLSVTPGDRVSLCRASQDISDYLNWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC; ch1808重链序列: (SEQ ID NO:82)

[0317] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGDTFTNGISWVKQRIGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNENFKGKALTADKSSTTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITSVIGADYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTKYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0318] ch1808轻链序列: (SEQ ID NO:83)

[0319] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTPFWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0320] hu1810-12重链序列: (SEQ ID NO:84)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMYELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0322] hu1810-12轻链序列: (SEQ ID NO:85)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYYTSTL
[0323] HSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISSLPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0324] ch1817重链序列: (SEQ ID NO:86)

[0325] EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKGRF
TISRDNANKNNLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SLGK;

[0326] ch1817轻链序列: (SEQ ID NO:87)

[0327] QFTLTQPKSVSGSLRSTITIP CERSSGDIGDSYVNWYQQHLGRPPLNVIYADVQRPSEVSDRFSGSID
SSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDTNIDIIFGGGKTLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0328] ch1822重链序列: (SEQ ID NO:88)

[0329] EVRLVESGGDFVQPGRSVKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVGSISTGGVNTYYRDSVKGRF
TISRDNASTLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTPDYHYGIYFAMDAGWQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SLGK;

[0330] ch1822轻链序列: (SEQ ID NO:89)

[0331] QVTLTQPKSVSGSLRSTITIP CERSSGDIGESYVNWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFSGSID
SSSNSASLTITNLQVDDEADYFCQSYDSSIDIFFGGGKTLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0332] 阳性对照: 度拉糖肽是双链形式, 单链为GLP-1/hIgG4 Fc (SEQ ID NO:90)

[0333] HEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG.

[0334] 实施例5: 抗体双特异性蛋白的克隆和表达

[0335] 采用人GLP-1肽作为双特异性蛋白中GLP-1受体激动剂部分, 将GCGR抗体作为双特异性蛋白的GCGR拮抗部分, 形成GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白。

[0336] 研究发现, GLP-1特定位点氨基酸突变 (如Q17E、I23V、K28R或G30R) 后, 形成的新GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白, 其体外稳定性更高, 其中将GLP-1A第17位的Q突变为E和第

23位的I突变为V形式 (GLP-1C)，稳定性最高。本公开GLP-1及其突变形式的非限制性实施例序列如下：

[0337] 表8.GLP-1A多肽及其变体序列

[0338]	GLP-1 肽名称 (相对于 GLP-1A 的突变点)	序列	SEQ ID NO
	GLP-1A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	91
	GLP-1B (Q17E)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGGG	92
	GLP-1C (Q17E G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRG	93
	GLP-1D (Q17E I23V)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGGG	94
	GLP-1E (Q17E I23V G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGRG	95
	GLP-1F (Q17E K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGG	96
	GLP-1G (Q17E I23V K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGG	97
	GLP-1H (Q17E K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRG	98
	GLP-1J (Q17E I23V K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRG	99

[0339] 利用同源重组技术,将本公开GLP-1肽的C末端氨基酸通过肽键或接头(linker)连接GCGR抗体重链N末端氨基酸。通过293表达系统进行常规表达,得到如表9所示的双特异性蛋白的模式结构:

[0340] 表9.GLP-1/GCGR双特异性蛋白的结构模式

[0341]	双特异性蛋白结构模式名称	结构模式 GLP-1-接头-Ab*
	双特异性蛋白 1	GLP-1A -接头-Ab
	双特异性蛋白 2	GLP-1B -接头-Ab

[0342]	双特异性蛋白 3	GLP-1C -接头-Ab
	双特异性蛋白 4	GLP-1D -接头-Ab
	双特异性蛋白 5	GLP-1E -接头-Ab
	双特异性蛋白 6	GLP-1F -接头-Ab
	双特异性蛋白 7	GLP-1G -接头-Ab
	双特异性蛋白 8	GLP-1H -接头-Ab
	双特异性蛋白 9	GLP-1-I -接头-Ab

[0343] *注:Ab为本公开所述GCGR抗体。GLP-1肽可以连接至GCGR抗体重链可变区的氨基端或连接至GCGR抗体轻链可变区的氨基端。经试验验证, GLP-1肽连接至GCGR抗体中重链可变区的氨基端的双特异性蛋白较连接至GCGR抗体轻链可变区的氨基端稳定性更佳。本公开GLP-1肽连接至GCGR全长抗体重链可变区的部分实施方式中双特异性蛋白结构示意图如图1所示。

[0344] 将不同GLP-1肽与不同抗体的重链氨基酸用接头(例如(GGGGS)₃)相连接, 形成以下蛋白:

[0345] 表10. 双特异性蛋白序列

双特异性蛋白名称	第一条链(含重链部分(SEQ ID NO)): GLP-1肽-接头-抗体重链(从N至C)	第二条链 (轻链部分)
[0346] hu1803-9A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPQGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTGPS SSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTIVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 100)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQDISNY LNWYQQK PGKAVKLL IYYSSTLHS GVPSRFSG SGSGTDYT LTISSLQPE DFATYYC QQTNIFPW TFGGGTKV EIKRTVAA PSVFIFPPS
	hu1803-9B	DEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ

[0347]

	TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 101)	ESVTEQDS KDSTYSLS STLTLSKA DYEKHKV YACEVTH QGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 79)
hu1803-9C	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIWLVKGRGGGG GGSGGGGGGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 102)	
hu1803-9D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVWLVKGGGGGG GSGGGGGGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 103)	

[0348]

hu1803-9E	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGRGGGG GGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 104)	
hu1803-9F	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGGGGG GSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 105)	
hu1803-9G	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGGGGG GSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS	

[0349]

	TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 106)	
hu1803-9H	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRGGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTY TNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 107)	
hu1803-9J	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 108)	
ch1805-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCK TSGYTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSIDPDNGG TIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTA VYYCTRDIYGGSSWFAYWGQGLTVTVSAASTKG	ch1805 轻 链序列： (SEQ ID NO: 81)

[0350]

	PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP <u>EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u> QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 109)	
ch1808-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQSGAELARPGASVKLSC KASGDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGE<u>IYPRSGN</u> TYYNENFKGKATLTADKSSTTAYMELRRLTSEDS AVYFCARSITSVIGADYFDYWGQGTTTLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP A<u>PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 110)	ch1808 轻 链序列： (SEQ ID NO: 83)
hu1810-12D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGE<u>IYPTSGNTYY</u> NEKFKGKATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCAS GVITTVVSTDYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL LGK (SEQ ID NO: 111)	hu1810-12 轻链序列： (SEQ ID NO: 85)

[0351]	ch1817-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSMKLSC AASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMDSLSEET ATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 112)	ch1817 轻 链 序 列 : (SEQ ID NO: 87)
	ch1822-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVRLVESGGDFVQPGRSVKLSC AASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVGSISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNAESTLYLQMDSLSEET ATYYCARHTTPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 113)	ch1822 轻链 序列: (SEQ ID NO: 89)

[0352] 此处双特异性蛋白中接头接头可选用 (GGGGS)₃, 在其他实施方式中也可以是肽键或其他常规用于多肽连接的接头, (GGGGS)₃ 的使用并不是对本公开双特异性蛋白接头的限制。编码GLP-1的核苷酸序列、编码GCGR抗体的核苷酸序列、接头蛋白片段 ((GGGGS)₃) 的核苷酸序列通过所属领域常规技术手段获得。利用同源重组技术将GLP-1的C末端核苷酸通过接头蛋白连接GCGR抗体的N末端核苷酸, 克隆到Phr-BsmBI载体上。重组的GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白在293细胞表达, 通过实施例6的方法进行纯化。纯化的蛋白可用于下述各实施例中。

[0353] 实施例6: 抗体双特异性蛋白的纯化

[0354] 细胞培养液高速离心后收集上清, 利用亲和层析进行第一步纯化。层析介质为与Fc相互作用的Protein A或者衍生填料, 如GE的Mabselect。平衡缓冲液为1×PBS (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH7.4), 平衡5倍柱体积后, 将

细胞上清上样结合,流速控制为样本在柱上保留时间 $\geq 1\text{min}$ 。上样结束后,用 $1\times\text{PBS}$ (pH7.4)冲洗柱子,直至A280紫外吸收降至基线。然后用0.1M甘氨酸(pH3.0)的洗脱缓冲液冲洗层析柱,根据A280紫外吸收峰收集洗脱峰,收集的洗脱样本用1M Tris (pH8.5)中和。

[0355] 将上述中和后的洗脱样本超滤浓缩后进行体积排阻层析,缓冲液为 $1\times\text{PBS}$,层析柱为XK26/60Superdex200 (GE),流速控制在 4ml/min ,上样体积小于 5ml ,根据A280紫外吸收合并目的蛋白峰。收集的蛋白经SEC-HPLC鉴定纯度大于95%,经LC-MS鉴定为正确后分装备用。得到GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白。

[0356] 测试例

[0357] 测试例1:GCGR嵌合抗体结合人、小鼠和食蟹猴GCGR的ELISA实验

[0358] 抗GCGR抗体的结合力通过抗体与过表达GCGR的CHO细胞的结合实验来检测。通过转染的方法分别将人、小鼠和食蟹猴GCGR全长质粒转进CHO细胞中加压筛选两周后,检测GCGR的表达量。将过表达细胞固定于96孔板底后,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和GCGR过表达CHO细胞的结合活性,三种种属GCGR抗体结合实验方法相同,以检测GCGR抗体结合人GCGR方法为例,具体实验方法如下:

[0359] 将细胞以 $0.9-1.0\times 10^6/\text{ml}$ 密度, $100\mu\text{l}$ /孔接种于96孔板中过夜培养。弃上清,用PBS洗三遍后,加入 $100\mu\text{l}$ /孔的细胞免疫固定液(Beyotime,Cat Wo.P0098)室温固定1小时,PBS洗四遍。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD skim milk,Cat Wo.232100)封闭液 $200\mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育箱孵育3小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(pH7.4 PBS含0.05% tween-20)洗板3次后,加入 $50\mu\text{l}$ /孔用样本稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体、嵌合抗体或人源化抗体),放于 37°C 孵育箱孵育2小时。孵育结束后用PBST洗板3次,加入 $50\mu\text{l}$ /孔用样本稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat Wo.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat Wo.109-035-003), 37°C 孵育1小时。用PBST洗板3次后,加入 $50\mu\text{l}$ /孔TMB显色底物(KPL,Cat Wo.52-00-03),于室温孵育10min,加入 $50\mu\text{l}$ /孔1M H_2SO_4 终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism 5分析数据,计算GCGR嵌合抗体对GCGR过表达CHO细胞的结合 EC_{50} 值,结果见下表。

[0360] 表11.嵌合抗体结合活性

[0361]	抗体 EC_{50} (nM)	ch1803	ch1805	ch1808	ch1810	ch1817	ch1822
[0362]	人 GCGR	0.1167	0.2969	0.6769	0.1168	0.1926	0.3834
	小鼠 GCGR	0.7183	0.3428	1.019	0.4415	0.1638	0.5681
	食蟹猴 GCGR	0.2128	0.3585	0.5356	0.2480	0.2968	0.4280

[0363] 结果显示各嵌合抗体ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817和ch1822均与人GCGR具有良好的细胞表面结合活性,并且与小鼠GCGR和食蟹猴GCGR也有较好的交叉亲和活性。

[0364] 测试例2:GCGR嵌合抗体阻断GCGR配体与GCGR结合试验

[0365] 1、测试目的:

[0366] 通过GCGR嵌合抗体阻断GCGR配体胰高血糖素与GCGR结合试验来评估GCGR嵌合抗体的拮抗活性。

[0367] 2、测试原理：

[0368] cAMP与CRE结合可启动CRE下游荧光素酶基因(luciferase)的表达,荧光素酶与其底物结合后发出荧光,通过荧光信号变化反映抑制效率。将CRE克隆至荧光素酶基因的上游,通过与含GCGR基因的质粒共转染CHO-K1细胞,挑选出同时高表达CRE及GCGR的单克隆细胞。GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白和胰高血糖素可竞争性的与GCGR结合,阻断GCGR的下游信号传递,影响下游cAMP的表达,通过测定荧光信号变化可评估GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白对GCGR的拮抗活性。

[0369] 3、测试样本：

[0370] 嵌合抗体ch1803,ch1805,ch1808,ch1810,ch1817,ch1822。

[0371] 4、实验步骤：

[0372] a.用新鲜细胞培养基制取细胞悬液,以20000个细胞/孔加入80μl培养体系的96孔细胞培养板中,5%二氧化碳,37℃培养16小时。

[0373] b.每孔分别加入10μl配制好的待测蛋白,再加入10μl配好的胰高血糖素,5%二氧化碳,37℃培养5小时。

[0374] c.每孔加入加100μl检测液ONE Glo (Promega),室温避光放置7分钟。

[0375] d.酶标仪Victor3上检测荧光,计算GCGR嵌合抗体融合对人、小鼠和食蟹猴GCGR配体胰高血糖素的结合阻断的IC50值及阻断效率Imax。

[0376] 表12.嵌合抗体拮抗活性

	抗体	人 GCGR		小鼠 GCGR	
		IC50 (nM)	Imax	IC50 (nM)	Imax (%)
[0377]	ch1803	79.3	100%	24.7	93%
	ch1805	95.03	91%	18	100%
	ch1808	105.2	98%	26.6	100%
[0378]	ch1810	72.46	100%	未检测	未检测
	ch1817	59.8	83%	12.8	96%
	ch1822	62.48	59%	15.96	87%

[0379] 测试例3:GCGR人源化抗体对GCGR配体与GCGR结合的阻断试验

[0380] 通过抗GCGR抗体阻断GCGR配体胰高血糖素与GCGR的结合试验来评估GCGR抗体的拮抗活性。实验原理和步骤同测试例2,结果见下表：

[0381] 表13.人源化抗体拮抗活性

[0382]

抗体	人 GCGR		抗体	人 GCGR	
	IC50 (nM)	I _{max}		IC50 (nM)	I _{max}
hu1803-1	191.1	91.8%	hu1810-1	189.1	83.2%
hu1803-2	137.12	98.5%	hu1810-2	105.9	100%
hu1803-3	109.55	96.7%	hu1810-3	192.2	95.42%
hu1803-4	139.75	100%	hu1810-4	137.5	99.1%
hu1803-5	79.03	100%	hu1810-5	216.4	86.39%
hu1803-6	77.48	100%	hu1810-6	156.8	100%
hu1803-7	73.04	100%	hu1810-7	119.3	100%
hu1803-8	85.92	100%	hu1810-8	132.9	100%
hu1803-9	78.39	100%	hu1810-9	124.7	90.4%
hu1803-10	76.67	100%	hu1810-10	95.56	97.42%
hu1803-11	88.72	100%	hu1810-11	91.32	99.61%
hu1803-12	86.92	100%	hu1810-12	75.91	99.65%

[0383] 体外活性生物学评价

[0384] 测试例4:GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白在PBS中的稳定性

[0385] 取200 μ g待测抗体双特异性蛋白溶于1ml 1 $\times$ PBS (pH7.4) 中,37 $^{\circ}$ C恒温箱存放;分别于0和14天取样,Agilent 6530Q-TOF进行LC-MS检测完整重链保留情况,结果如下表14所示。含各突变改造的GLP-1肽的双特异性蛋白均较含GLP-1A (SEQ IDNO:91) 的双特异性蛋白稳定性大大提高,并且hu1803-9B、hu1803-9D和hu1803-9G显示出更良好的稳定性。

[0386] 表14.GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白的稳定性检测

[0387]

蛋白	第 14 天
hu1803-9A	70.12%
hu1803-9B	$\geq 97\%$
hu1803-9C	93.98%
hu1803-9D	$\geq 97\%$
hu1803-9E	94.15%
hu1803-9F	94.65%

[0388]

hu1803-9G	$\geq 97\%$
-----------	-------------

[0389] 测试例5:基于细胞的GCGR结合阻断实验

[0390] 实验原理和步骤同测试例2。

[0391] 测试样本:

[0392] ①GCGR抗体 (hu1803-9, hu1810-12)

[0393] ②双特异性蛋白hu1803-9B, hu1803-9D。

[0394] 表15. 双特异性蛋白对GCGR的拮抗活性

	蛋白	对人GCGR的拮抗活性	
		IC50 (nM)	Imax (%)
[0395]	hu1803-9	54	100
	hu1803-9B	67	100
	hu1803-9D	79	100

[0396] 表16. 人源化抗体对小鼠和食蟹猴GCGR的拮抗活性

	抗体	小鼠 GCGR		食蟹猴 GCGR	
		IC 50(nM)	Imax (%)	IC 50(nM)	Imax (%)
[0397]	hu1803-9	11.22	100%	220	100%
	hu1810-12	17.54	97%	886	99%

[0398] 图2和表15显示hu1803-9B和hu1803-9D均能完全抑制GCGR的拮抗活性,且与GCGR单抗具有相当的功效和IC50(抑制最大活性的50%所需的浓度),表明hu1803-9B和hu1803-9D均保留了GCGR抗体部分完全的生物活性。除验证hu1803-9及含有hu1803-9的双特异性蛋白具有抑制人GCGR的拮抗活性外,进一步地还证明(见表16) hu1803-9和hu1810-12具有抑制小鼠GCGR和食蟹猴GCGR的拮抗活性。

[0399] 测试例6:基于细胞的GLP-1R结合激活实验

[0400] 1、测试目的:

[0401] 评估GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白的GLP-1部分对GLP-1R的激活活性。

[0402] 2、测试原理:

[0403] cAMP与CRE结合可启动CRE下游荧光素酶基因的表达,荧光素酶与其底物结合后发出荧光,通过荧光信号变化反映抑制效率。将CRE克隆至荧光素酶基因的上游,通过与含GLP-1R基因的质粒共转染CHO-K1细胞,挑选出同时高表达CRE及GLP-1R的单克隆细胞。GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白和阳性对照度拉糖肽可与GLP-1R结合,激活GLP-1R的下游信号传递,刺激下游cAMP的表达,通过测定荧光信号变化可评估GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白对GLP-1R的激活活性。

[0404] 3、测试样本:

[0405] ①阳性对照:度拉糖肽

[0406] ②hu1803-9B, hu1803-9D。

[0407] 4、实验步骤:

[0408] a. 用新鲜细胞培养基制取细胞悬液,以25000个细胞/孔加入90μl培养体系的96孔细胞培养板中,5%二氧化碳,37℃培养16小时。

[0409] b. 每孔分别加入10μl配制好的待测蛋白,5%二氧化碳,37℃培养5小时。

[0410] c. 每孔加入加100μl检测液ONE Glo (Promega),室温避光放置7分钟。

[0411] d. 酶标仪Victor3上检测荧光,计算GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白对GLP-1R的结合激活的EC50值。

[0412] 表17. 双特异性蛋白对GLP-1R的激活活性

[0413]	蛋白	EC50 (nM)	E _{max} (%)
	度拉糖肽	0.21	100
	hu1803-9B	0.22	100
	hu1803-9D	0.32	100

[0414] 图3和表17显示hu1803-9B和hu1803-9D均能完全激活GLP-1R,且与阳性对照度拉糖肽具有相当的功效和EC50(激活最大活性的50%所需的浓度),表明hu1803-9B和hu1803-9D均保留了GLP-1部分完全的生物活性。

[0415] 表18. 双特异性蛋白对人GLP-1R的激活活性

[0416]	样本	EC50 (nM)	E _{max} %
	ch1805-D	0.11	108
	ch1808-D	0.14	107
	ch1817-D	0.30	106

[0417] 表18显示ch1805-D、ch1808-D、ch1817-D嵌合抗体与GLP1肽连接均能完全激活GLP-1R,且与阳性对照度拉糖肽具有相当的功效和EC50(激活最大活性的50%所需的浓度),表明不同GCGR抗体与GLP1肽以本公开的方式连接所形成的双特异性蛋白不影响GLP1肽的生物活性。

[0418] 药代动力学评价

[0419] 测试例7:C57小鼠体内药代动力学检测

[0420] 实验用C57小鼠4只,雌性,12/12小时光/暗调节,温度24±3℃恒温,湿度50-60%,自由进食饮水。购自杰思捷实验动物有限公司。实验当天对C57小鼠分别尾静脉注射等摩尔hu1803-9D和阳性对照药物度拉糖肽,给药剂量分别为6mg/kg和2.35mg/kg,注射体积为10ml/kg。

[0421] 因本公开的GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白和阳性对照度拉糖肽均与小鼠有交叉活性,因此在小鼠体内药物代谢时间较短,选择的取血时间点为:第1天给药后0h、1h、24h(第2天),第3天,于小鼠眼底静脉取血,每次150μl(采血前,提前向采血管中加入1.5μl的DPP-4抑制剂);收集的血样在4℃下置放半小时至凝集,然后4℃下14000×g离心5分钟。收集上清(约80μl),立即放置-80℃贮存。

[0422] 检测流程描述如下:

[0423] a. 1μg/mL抗-GLP1 (Novus,NBP1-05180) 抗体铺板,4℃过夜。

[0424] b. 250μl 1×PBST洗涤4次,加入200μl含5%脱脂牛奶的PBS,37℃封闭3小时。

[0425] c. 250μl 1×PBST洗涤4次,加入100μl小鼠空白血清梯度稀释的待测药物,37℃孵育2小时。

[0426] d. 250μl 1×PBST洗涤3次。

[0427] e. 每孔加入100μl辣根过氧化物酶标记的二抗抗人IgG Fc,37℃孵育1小时。

[0428] f. 250μl 1×PBST洗涤3次。

[0429] g. 每孔加入100μl TMB,室温孵育10分钟后加入100μl 1M H₂SO₄终止反应。

[0430] h. 酶标仪上检测450nm测吸收值,Graphpad Prism5分析数据。

[0431] 表19. 双特异性蛋白在小鼠中的T_{1/2}

[0432]	受试药物	给药方式	T1/2 (h)
	hu1803-9D	IV (6mg/kg)	23.4
	度拉糖肽	IV (2.35mg/kg)	10

[0433] PK分析结果表明,本公开双特异性蛋白分子hu1803-9D在小鼠体内的半衰期约为23.4h,为阳性对照药物半衰期的2倍。

[0434] 体内活性生物学评价

[0435] 测试例8:ob/ob小鼠体内药效实验

[0436] 1、本实验应用的小鼠品系为糖尿病ob/ob小鼠和同龄野生型小鼠(南京大学南京模式动物研究所),目的为观察GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白连续多次给药后对ob/ob小鼠血糖、糖化血红蛋白、体重、摄食量等糖尿病相关指标的治疗作用。

[0437] 实验进行前对模型组动物按照实验当天的随机和空腹体重、随机和空腹血糖将其分成6组,分别为:

[0438] 模型对照组、2.84mg/kg、1.42mg/kg GCGR单抗组(hu1803-9)、1.16mg/kg阳性对照组(度拉糖肽)和3mg/kg、1.5mg/kg hu1803-9D,模型对照组小鼠皮下注射(S.C.)给予磷酸盐缓冲液,各组小鼠每周1次皮下注射(9:00AM),一共4次(表20)。

[0439] 表20. 试验分组及给药情况

[0440]	组别	处理	剂量	给药频率	给药方式
	1	ob/ob小鼠模型对照组	PBS	每周一次x4周	S.C.
	2	GCGR单抗低剂量组	1.42mpk	每周一次x4周	S.C.
	3	GCGR单抗高剂量组	2.84mpk	每周一次x4周	S.C.
	4	阳性对照高剂量组	1.16mpk	每周一次x4周	S.C.
	4	hu1803-9D低剂量组	1.5mpk	每周一次x4周	S.C.
	5	hu1803-9D高剂量组	3mpk	每周一次x4周	S.C.

[0441] 2、实验步骤:

[0442] a. 每周测定一次空腹和随机体重,每天测定一次摄食量和饮水量。

[0443] b. 首次给药前及给药后第1、2、3、7天测随机血糖,后每周测一次随机血糖。首次给药前及给药后第3、7天测6h空腹血糖,后每周测一次空腹血糖。

[0444] c. 给药第26天,动物禁食6h(8:00-14:00)后,单次腹腔给予葡萄糖水溶液2g/kg,并将给糖时间记为0点,在给糖前0min,给糖后15,30,60,90,120min分别对动物进行血糖检测,根据时间对血糖数据绘制糖耐量曲线,计算曲线下面积(AUC)。

[0445] d. 实验结束后,小鼠禁食6小时(8:00-14:00)后给予安乐死,心脏取血后全血分为两部分,一部分约30μl注入已加好抗凝剂离心管并存放于湿冰中用于糖化血红蛋白测定,另一部分静置后离心取血清用于TG、FFA、CHOL、HDL、LDL水平测定。

[0446] e. 数据采用graphpad Prism 6软件分析,采用Student-t test对数据进行统计学分析。

[0447] 3、实验结果:

[0448] 1) 长期用药对ob/ob小鼠随机血糖的影响:

[0449] 如图4所示,整个试验期间,模型对照组ob/ob小鼠随机血糖维持在较高的水平,一周一次皮下注射不同剂量各组药物后,各组小鼠的随机血糖均有不同程度的下降,呈现良

好的剂量效应且显著低于模型对照组。2.84mg/kg的hu1803-9给药和3mg/kg hu1803-9D给药的降糖效果显著优于其他各试验组,而3mg/kg hu1803-9D给药第3、6、14和30天的随机血糖效果更佳。

[0450] 2) 长期用药对ob/ob小鼠饥饿血糖的影响:如图5所示,整个试验期间,模型对照组ob/ob小鼠随机血糖维持在较高的水平,一周一次皮下注射不同剂量各组药物后,各组小鼠的饥饿血糖均有不同程度的下降,呈现良好的剂量效应且显著低于模型对照组。与随机血糖浓度试验相似,2.84mg/kg的hu1803-9给药和3mg/kg hu1803-9D给药的降糖效果显著优于其他各试验组,而3mg/kg hu1803-9D给药第3、6、13和30天的饥饿血糖效果更佳。

[0451] 3) 长期用药对ob/ob小鼠糖化血红蛋白(HbA1c)的影响:

[0452] 结果如表21所示,ob/ob小鼠一周一次皮下注射不同剂量各组药物30天后,糖化血红蛋白水平均有不同程度的下降,且显著低于模型对照组($P<0.05$),3mg/kg和1.5mg/kg的hu1803-9D组糖化血红蛋白水平分别为 $5.5\pm0.2\%$ 和 $4.7\pm0.1\%$,呈明显的剂量效应关系;其中3mg/kg的hu1803-9D组低于等摩尔的1.16mg/kg阳性对照度拉糖肽及2.84mg/kg的GCGR单抗hu1803-9($P<0.05$)。

[0453] 表21. 长期用药对ob/ob小鼠HbA1c%的影响

[0454]	组别	HbA1c (%)	下降百分比
	ob/ob 模型对照组	6.3±0.3	-
	hu1803-9-1.42mpk	5.2±0.1	17.46%
	hu1803-9-2.84mpk	5.2±0.1	17.46%
	度拉糖肽-1.16mpk	5.6±0.1	11.1%
	hu1803-9D-1.5mpk	5.5±0.2	12.7%
	hu1803-9D-3mpk	4.7±0.1	25.4%

[0455] 测试例9:GCGR抗体的竞争性ELISA实验

[0456] 通过生物素标记的抗体与不同浓度的标准抗体竞争结合过表达GCGR的CHO细胞的ELISA实验来检测,对GCGR抗体与GCGR结合的表位分类。细胞板准备方法与测试例1相同,后续具体实验方法如下:

[0457] 按生物素标记试剂盒说明书标记抗体(Dojindo Molecular Technologies, Inc.LK03)。在96孔细胞板中,按50μl/孔用样本稀释液稀释的不同浓度未生物素标记待测抗体,放于37℃孵育2小时。孵育结束后用PBST洗板3次,加入50μl/孔用样本稀释液稀释至0.1μg/ml的生物素标记抗体,37℃孵育2小时后用PBST洗板3次,加入HRP标记的羊抗人二抗(Jackson Immuno Research, Cat No.109-035-003),37℃孵育1小时。用PBST洗板3次后,加入50μl/孔TMB显色底物(KPL, Cat No.52-00-03),于室温孵育10min,加入50μl/孔1M H₂SO₄终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism 5分析数据。

[0458] 当生物素标记抗体竞争结合至细胞板上的浓度越低时,OD值越低,反之信号越高。按公式 $IC\% = (\text{待测抗体最高OD}_{450nm} - \text{待测抗体最低OD}_{450nm}) / (\text{待测最高OD}_{450nm} - \text{标记抗体最低OD}_{450nm})$ 计算竞争效率,结果见下表22。

[0459] 表22.各抗体间竞争结合关系

[0460]		竞争抗体				
	抗体	ch1808	hu1803-9	hu1810-12	ch1817	ch1822
	ch1805	100%	100%	100%	-	-
	ch1808	100%	46.60%	54.30%	-	-
	hu1803-9	100%	100%	100%	-	-
	hu1810-12	100%	100%	100%	-	-
	ch1817	-	-	-	100%	100%
	ch1822	-	-	-	75.40%	100%

[0461] 结果显示, ch1817与ch1822具有非常相近的表位, ch1808、hu1803-9和hu1810-12具有非常相近的表位; 而ch1808、hu1803-9和hu1810-12的表位推测在ch1805的表位范围内。

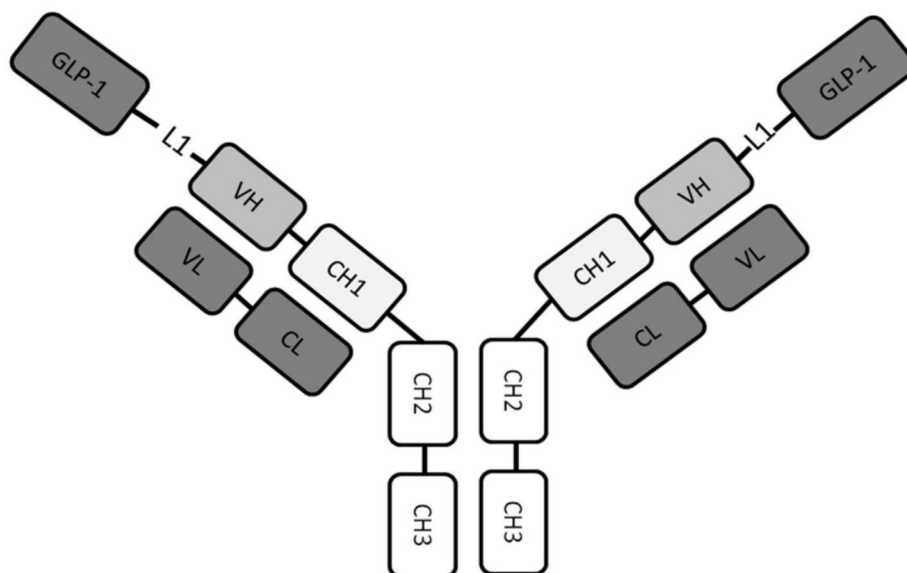


图1

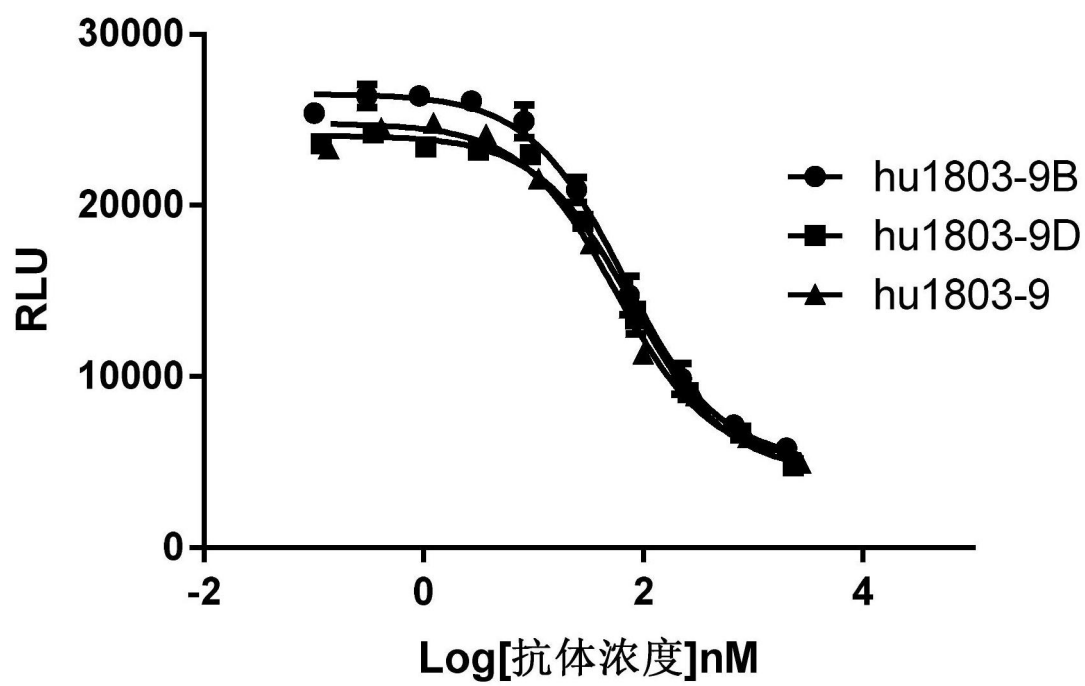


图2

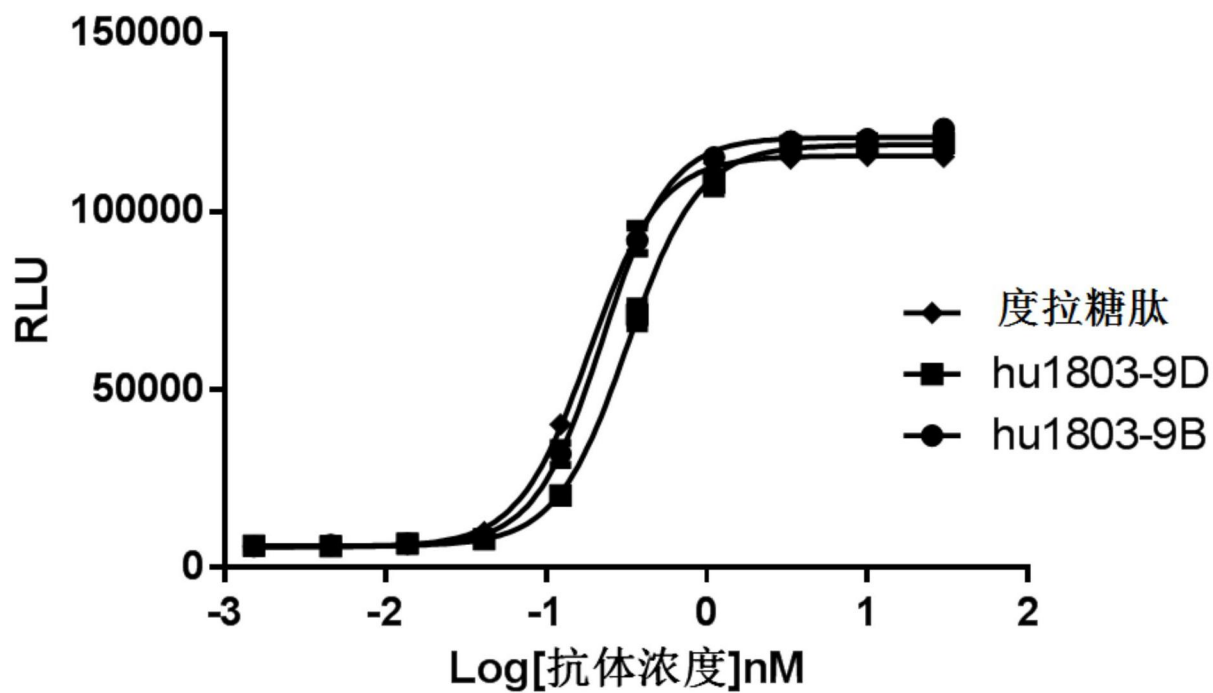


图3

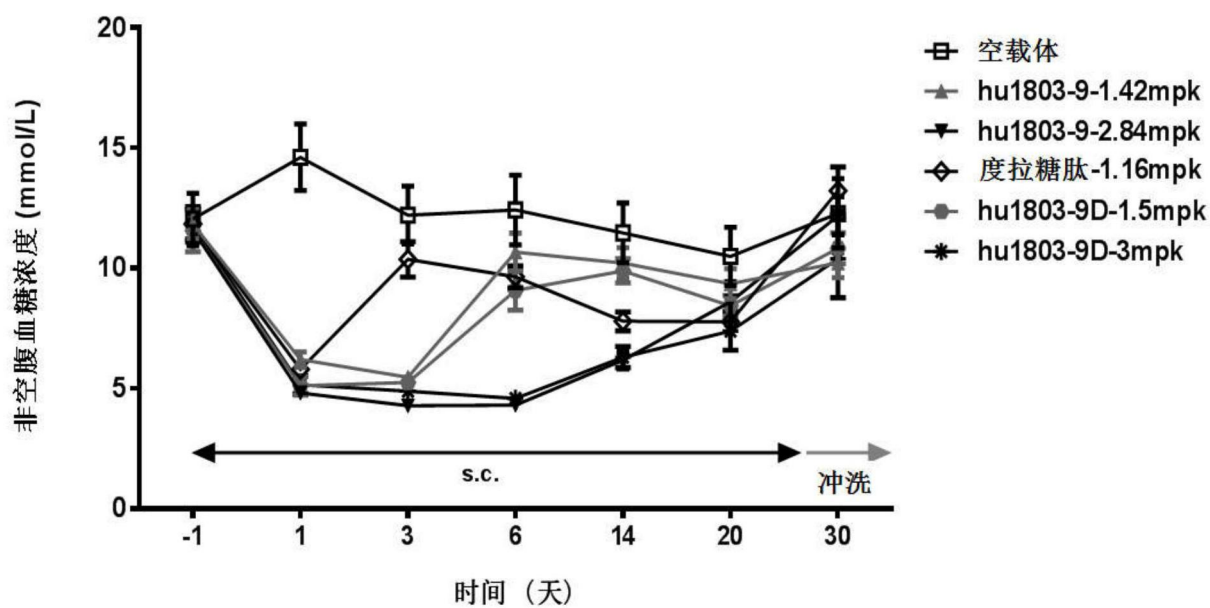


图4

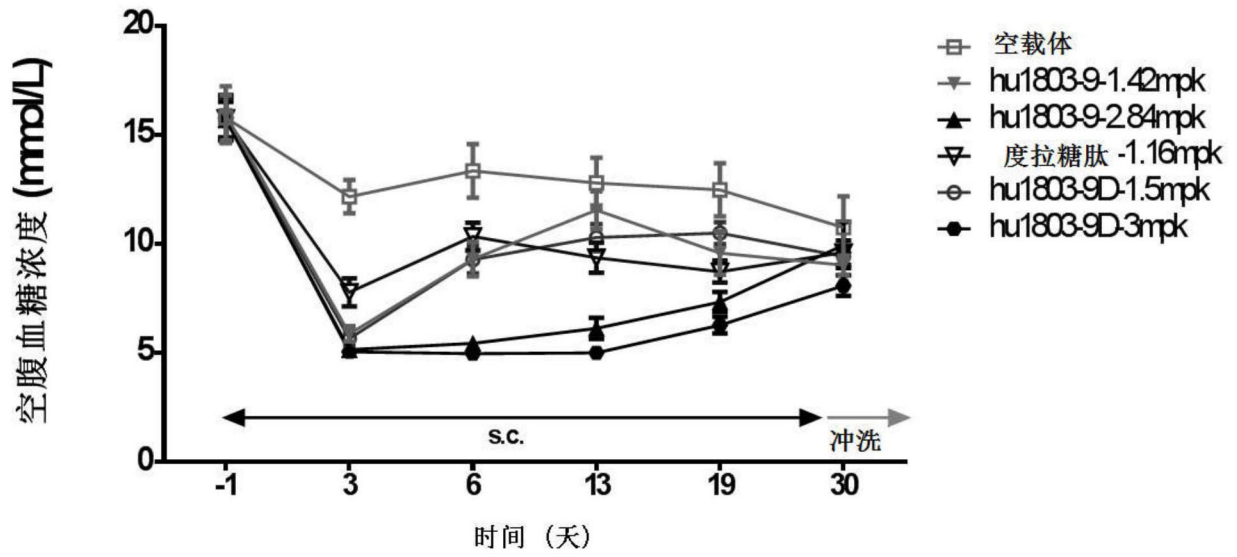


图5